

**Untersuchungen zur Funktion
und Regulation
des Tight Junction Moleküls Claudin-1
in der Brusttumorgenese**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von Robert Macek
aus Burghausen

2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 11. Dezember 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. Reinhard Wirth (Vorsitzender)

Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer

Prof. Dr. Manfred Kubbies

Prof. Dr. Richard Warth

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	4
2.1. Entstehung und Progression solider Tumore.....	4
2.2. Organisation epithelialer Zellverbände.....	6
2.3. Struktur und Funktion Tight Junction assoziierter Prozesse.....	8
2.4. Regulation der Tight Junction Barrierefunktion in der Tumorgenese.....	11
2.5 Verlust der Tight Junction Barrierefunktion in der Tumorgenese.....	13
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	16
3. Materialien und Methoden.....	17
3.1 Materialien.....	17
3.1.1 Geräte.....	17
3.1.2 Reagenzien.....	18
3.1.3 Standardpuffer.....	21
3.1.4 Antikörper.....	22
3.1.5 Oligonukleotide.....	23
3.1.6 Niedermolekulare Wirksubstanzen.....	23
3.1.7 Zelllinien.....	24
3.1.8 Zellkulturbedarf.....	24
3.1.9 Materialien.....	24
3.2 Methoden.....	25
3.2.1. Molekulargenetische und proteinchemische Methoden.....	25
3.2.1.1 RNA-Isolierung	25
3.2.1.1.1 Gewinnung von Gesamt-RNA.....	25
3.2.1.1.2 Gewinnung von mRNA.....	26
3.2.1.2 RNA-Quantifizierung.....	26
3.2.1.3 Semiquantitative RT-PCR.....	27
3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.2.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung.....	28
3.2.1.6 Gewinnung zellulärer Proteinextrakte.....	28
3.2.1.7 Proteinquantifizierung von Zellextrakten.....	29
3.2.1.8 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western-Blot Analyse.....	29
3.2.1.9 ELISA-Nachweis Histon H4 Acetylierung.....	30
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	31
3.2.2.1 Zellkultur.....	31
3.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	31
3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Generationszeit eukaryotischer Zellen.....	32
3.2.2.4 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) konfluenten Zellschichten.....	32
3.2.2.5 Bestimmung der parazellulären Molekülfluxrate.....	32

3.2.3 Immunzytochemie adhärenter Tumorzellen.....	33
3.2.4 Tierversuche.....	34
3.2.4.1 Haltung und Fütterung der Mäuse.....	34
3.2.4.2 Subkutane Injektion von Tumorzellen.....	34
3.2.4.3 Messung von Tumorgröße und Körpergewicht.....	35
3.2.4.4 Abbruchkriterien und Versuchsende.....	35
3.2.5 Histologische und immunhistochemische Analyse.....	35
3.2.5.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte.....	35
3.2.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-1.....	36
3.2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD34-positiven Gefäßen.....	37
3.2.5.4 HE-Färbung.....	38
3.2.6 Durchflußzytometrie.....	38
3.2.6.1 Analyse der Zellvitalität.....	38
3.2.6.2 Messung der Zellzyklusverteilung.....	39
3.2.6.3 Claudin-1 Expressionsanalyse.....	39
3.2.6.4 Apoptoserate in 2D und 3D Zellkulturen (Annexin-V Fluos).....	39
3.2.6.5 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Xenograft-Tumoren.....	40
3.2.6.6 Nachweis apoptotischer Zellen in Xenograft-Tumoren (TUNEL).....	40
3.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	41
3.2.7.1 Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Proben.....	41
3.2.7.2 Einbettung.....	41
3.2.7.3 Trimmen, Schneiden und Mikroskopie der Proben.....	41
3.2.7.4 Gefrierbruchätzung.....	42
4. Ergebnisse.....	43
4.1 Expression und Funktion von Tight Junctions in Brusttumorzellen.....	43
4.1.1 Molekulare Expressionsanalyse von Claudin-1 in Brusttumorzelllinien.....	43
4.1.2 Zelluläre Expression und Lokalisation von Claudin-1.....	44
4.1.3 Funktionelle Analyse der Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen.....	46
4.1.4 Expression von Tight Junctions assoziierten Proteinen in Brusttumorzelllinien.....	47
4.2 Funktionelle Bedeutung von Claudin-1 in Brusttumorzellen.....	49
4.2.1 In vitro Charakterisierung in Brusttumorzellen.....	49
4.2.1.1 Expression von Claudin-1 in Claudin-1 retroviral transduzierten Brusttumorzellen.....	49
4.2.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Claudin-1 Reexpression.....	52
4.2.1.3 Parazellulärer Molekülflux in Abhängigkeit von der Claudin-1 Expression.....	54
4.2.1.4 Claudin-1 abhängiger Zelltod in MDA-MB 361 Sphäroid-(3D) Zellkulturen.....	55
4.2.2 In-vivo Charakterisierung im Maus-Xenograft Brusttumormodell.....	61
4.2.2.1 Tumorwachstum und Überlebensrate.....	62
4.2.2.2 Analyse der Expression von Claudin-1 in Xenografttumoren.....	65
4.2.2.3 Durchflußzytometrische Zellzyklus- und Apoptoseanalyse der Xenografttumoren.....	67
4.2.2.4 Claudin-1 abhängige Apoptose-/Zelltodinduktion.....	68
4.2.2.5 Proliferation der Brusttumorzellen in den Xenografttumoren.....	69
4.2.2.6 Stromaanteil und Gefäßversorgung der Xenografttumore.....	71

4.3 Untersuchung epigenetischer Regulationsmechanismen der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen.....	73
4.3.1 Ras-Signaltransduktionsweg.....	73
4.3.1.1 Expression von Ras in T47-D und MCF-7 Brusttumorzellen.....	73
4.3.1.2 MEK-1 Inhibition und Expression Tight Junction assoziierter Proteine.....	74
4.3.1.3 Inhibition der MEK-1 Aktivität und Lokalisation von Claudin-1.....	76
4.3.1.4 Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen nach MEK-1 Inhibition.....	80
4.3.2 Promotormethylierung des Claudin-1 Gens.....	80
4.3.3 Bedeutung nukleärer Retinoid-Rezeptor Signalwege.....	81
4.3.4 Einfluss der Chromatinstruktur.....	86
4.3.4.1 ELISA-Nachweis der Histon H4 Acetylierung.....	87
4.3.4.2 Expression von Claudin-1 nach HDAC Inhibition.....	88
4.3.4.3 HDAC Inhibition und Retinoid-Rezeptor Aktivierung.....	90
4.3.4.4 Zelluläre Lokalisation Tight Junction assoziierter Proteine nach HDAC Inhibition	94
4.3.4.5 Einfluß der HDAC Inhibition auf Zellmorphologie und Zytoskelett-Organisation..	98
4.3.4.6 Analyse der Tight Junctions Diffusionsbarriere nach HDAC-Inhibition.....	101
5. Diskussion.....	102
6. Literaturverzeichnis.....	124
7. Abkürzungsverzeichnis.....	139
Anhang.....	141

1. Zusammenfassung

Integrale Membranproteine der Claudin-Familie stellen die funktionellen Hauptkomponenten des Tight Junction Komplexes in normalen epithelialen und endothelialen Geweben dar. In ontogenetisch unterschiedlichen, epithelialen Tumoren wurden jedoch abberante Tight Junction Strukturen sowie eine dysregulierte Expression und Membranlokalisation Tight Junction assoziierter Proteine nachgewiesen. Dies führte zu der Hypothese, daß der Expressionsverlust von Tight Junctions zu einer verbesserten parazellulären Diffusion von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in soliden Tumoren beiträgt und damit einen entscheidenden, fördernden Schritt in der Tumorprogression darstellt.

Etwa zeitgleich mit der Beschreibung des homologen, murinen Claudin-1 Moleküls wurde 1998 das humane Claudin-1 Gen mit Hilfe der Differential Display Technik identifiziert. Northern-Blot Untersuchungen zeigten, daß die Claudin-1 mRNA Expression in einer Reihe von Brusttumorzelllinien im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen stark verringert oder nicht mehr nachweisbar war. Funktionelle Studien deuteten darauf hin, daß Claudin-1 in normalen Epithelien eine wesentliche Komponente von Tight Junctions darstellt, die zu einer Inhibition der parazellulären Ionen- und Molekülpassage führt. In einer in vivo Prävalenzanalyse wurde zusätzlich nachgewiesen, daß die physiologische Claudin-1 Expression und Membranlokalisation normaler Brustepithelzellen in eine rein zytoplasmatische Lokalisation in differenzierten Brusttumorzellen übergeht und sich in stark dedifferenzierten Brusttumorzellen fast vollständig verliert. Die Sequenzanalyse des Claudin-1 Gens in Brusttumoren und Brusttumorzelllinien ergab keine signifikanten Mutationen der Claudin-1 Gensequenz sowie promotornaher Sequenzbereiche, was darauf hindeutet, daß epigenetische Faktoren am Expressionsverlust von Claudin-1 in der Brusttumorgenese beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die zellphysiologische Bedeutung von Claudin-1 in der Brusttumorgenese sowie mögliche am Expressionsverlust von Claudin-1 in Brusttumorzellen beteiligte epigenetische Regulationsmechanismen untersucht werden. Um die Bedeutung des Verlust der Claudin-1 Expression und Membranlokalisation in der Brusttumorgenese zu verstehen, wurden Claudin-1 negative und Claudin-1 retroviral transduzierte Brusttumorzellen phänotypisch in Monolayerkulturen, Sphäroiden und Xenograft-Modellen analysiert. Um eine Überlagerung des Phänotyps der Claudin-1 Reexpression mit anderen Claudinen möglichst zu vermeiden, wurde für die physiologischen Studien MDA-MB 361 als Zellmodell gewählt, in denen weder Claudin-1, -2, -3, -4 noch Occludin nachgewiesen werden konnte. Für die Untersuchungen zur epigenetischen

Expressionskontrolle kamen zusätzlich sieben Brusttumorzelllinien mit unterschiedlichem Expressions- und Lokalisationsmuster von Claudin-1, -3 und -4 zur Anwendung.

Die detaillierte Analyse des Expressionsstatus von Claudin-1 in verschiedenen differenzierten Brusttumorzelllinien ergab eine hohe Expression in einer Zelllinie, eine stark reduzierte Expression in fünf und nicht detektierbare Claudin-1 mRNA und Proteinexpression in zwei von acht untersuchten Brusttumorzellmodellen. In der vorliegenden Arbeit konnte mit nativ Claudin-1 positiven Zellen erstmals gezeigt werden, daß die Claudin-1 Proteinsynthese sowie der gerichtete Membrantransport offensichtlich primär posttranskriptionell und nicht transkriptionell in Abhängigkeit etablierter Zell-Zellkontakte reguliert wird.

Für die zellphysiologischen Studien wurden retroviral Claudin-1 transduzierte MDA-MB 361 Zelllinien mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation verwendet, die ein dem klinischen Expressionsbild ähnliches zelluläres Claudin-1 Lokalisationsmuster wie in normalem Brustepithel- und Brusttumorgewebe aufwiesen. Während in Claudin-1 negativen MDA-MB 361 Zellen keine Tight Junction Strukturen gefunden wurden, führte die Claudin-1 Reexpression zu einer Rekonstitution kontinuierlicher Tight Junction ähnlicher Strangstrukturen an Zell-Zellkontakten und abhängig von der Qualität der Claudin-1 Membranlokalisation zu einer parazellulären Fluxinhibition für Moleküle bis 0.3 bis 40 kDa. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Reexpression von Claudin-1 in MDA-MB 361 Zellen keinen Einfluß auf die Proliferations- und Zelltodrate in 2D Monolayerkulturen hat. In 3D Sphäroidkulturen fand sich jedoch unabhängig von der Sphäroidgröße in MDA-MB 361 Sphäroiden mit membranständiger Claudin-1 Expression eine signifikant erhöhte Zahl toter Zellen in zentralen Sphäroidbereichen sowie eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu Claudin-1 negativen und Claudin-1 positiven Sphäroiden mit vorwiegend zytoplasmatischer Claudin-1 Lokalisation. Tierstudien mit SCID-Mäusen ergaben, daß die Expression von Claudin-1 in Verbindung mit Membranlokalisation in MDA-MB 361 Xenografttumoren ebenfalls zu einer deutlich erhöhten Zelltod- und Apoptoserate, einer signifikanten Reduktion des Tumorstwachstums um ca. 60 % sowie einer deutlich verlängerten Überlebenszeit der Mäuse verglichen mit den Kontrollgruppen führte. Diese an einem Brusttumormodellsystem erzielten Ergebnisse zeigen erstmals, daß dem Verlust der Expression und/oder Membranlokalisation von Claudin-1 in vivo eine wichtige Bedeutung in der Tumorprogression zukommt.

Als Ursachen für die Inaktivierung oder Verringerung der transkriptionellen Aktivität von Claudin-1 in Brusttumorzellen kamen unter anderem die Methylierung des Claudin-1 Promotors, die fehlende Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder Signalkaskaden sowie eine Repression der Claudin-1 Genexpression aufgrund von Chromatinkondensation in Betracht. Die Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine Methylierung der Claudin-1 Promotorsequenz. Ebenso wenig

konnte ein Zusammenhang einer erhöhten Ras-Aktivität und dem Ras-MEK-ERK Signaltransduktionsweg mit der Regulation von Claudin-1 sowie der Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen nachgewiesen werden. Um die Bedeutung des Retinoid-Rezeptorsignalwegs und der Chromatinkondensation für die transkriptionelle Repression von Claudin-1 in der Brusttumorgenese zu untersuchen, wurden acht verschieden differenzierte Brusttumorzelllinien mit Retinoiden und Histondeacetylase-Inhibitoren unterschiedlicher Wirkspezifität behandelt. Dabei zeigte sich, daß sowohl der Retinoid-Rezeptorsignalweg als auch die Chromatinstruktur für die Regulation der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen bedeutsam sind. Da die untersuchten Zellmodelle jedoch heterogen reagierten und die maximale Expressionshöhe nicht erreicht wurde liegt es nahe zu vermuten, daß zusätzliche außer den untersuchten Faktoren für den Expressionsverlust von Claudin-1 verantwortlich sein müssen. Die Ergebnisse der Aktivator- und Inhibitorstudien deuten desweiteren darauf hin, daß der Transkription und Translation sowie dem Membrantransport von Claudin-1 in Brusttumorzellen komplexe und möglicherweise voneinander unabhängige Regulationsmechanismen zugrundeliegen.

Insgesamt betrachtet unterstützen die in dieser Arbeit durchgeführten Studien die Hypothese, daß der Verlust der epithelialen parazellulären Permeationskontrolle zu einer verbesserten Stoffdiffusion führt und damit das Wachstum solider Tumore fördert. Somit wäre die Induktion eines eingeschränkten Stoffaustausches durch Rekonstitution funktioneller Tight Junctions in Tumoren zusätzlich zur Blockierung der Neovaskularisierung ein neues Konzept das Wachstum solider Tumore zu hemmen und somit von hoher therapeutischer Relevanz.

2. Einleitung

2.1 Entstehung und Progression solider Tumoren

Die Tumorgenese solider Tumoren stellt einen komplexen mehrstufigen Prozess dar, in dessen zeitlichem Verlauf Einzelzellen durch initial transformierende Ereignisse Wachstumsvorteile gegenüber benachbarten Zellen des Gewebeverbandes erlangen (1, 2). In diskreten Schritten bilden transformierte Zellen durch einen evolutiven Selektionsprozess neue Eigenschaften aus, die eine Invasion in das umgebende Gewebe sowie eine Metastasierung in ferne Gewebe ermöglichen (3). Die Hypothese der Mehrschritt-Karzinogenese wird sowohl einerseits direkt durch molekulargenetische Untersuchungen mit der Identifizierung multipler somatischer Mutationen in Tumorzellen als auch andererseits indirekt durch die zunehmende Inzidenz menschlicher Tumore mit steigendem Lebensalter belegt (4-6). Als Ursache für die maligne Transformation kommt der konstitutiven Aktivierung von zellulären Onkogenen („gain of function“) sowie der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen („loss of function“) eine besondere Bedeutung zu (7). Onkogene sind mutierte Proto-Onkogene, deren Genprodukte an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse, insbesondere an der Steuerung der Zellproliferation beteiligt sind (8). Allen Onkogenen ist gemeinsam, daß sie für Proteine kodieren, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. Oncogene üben eine biologische Funktion als extrazelluläre Wachstumsfaktoren (sis), membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (erbB), membrangebundene G-Proteine (ras), nukleäre Hormonrezeptoren (erbA), Transkriptions-faktoren (jun, fos), Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (src, abl) oder Regulatoren des Zellzyklus (CDKs) aus (9-15). Während genetische Abberationen in Onkogenen meist dominant sind und für die Aktivierung von Signalwegen die Mutation eines Allels ausreichend ist, müssen für den Funktionsverlust von Tumor-Suppressorgenen beide Allele mutiert sein, wobei in der Regel ein inaktiviertes Allel in der Keimbahn vorliegt und das zweite Allel durch eine somatische Mutation ausgeschaltet wird (loss of heterozygosity) (16). Tumor-Suppressorgene kodieren dabei für Genprodukte wie RB und p53, deren normale Funktion in einer negativen Kontrolle des Zellzyklus besteht (17). Sowohl die Aktivierung von Onkogenen als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen zu einer erhöhten Proliferationsrate transformierter Zellen.

Bei der Entstehung von Karzinomen, die sich aus Epithelzellen entwickeln und über 90 % aller menschlichen Tumore darstellen, ist der Übergang von normalen Epithelien zum Carcinoma *in situ* zellmorphologisch durch eine Entdifferenzierung der Zellen sowie durch einen zunehmenden Verlust der normalen Gewebestruktur mit der Ausbildung mehrschichtiger Tumorzellverbände gekennzeichnet (18). Bedingt durch die irreguläre räumliche Struktur dieser Zellverbände und der

damit verbundenen eingeschränkten Diffusion essentieller Biomoleküle stoppt das Tumorwachstum bereits ab einem Volumen von 1-2 mm³, sofern keine Nähr- und Sauerstoffversorgung durch Neovaskularisierung erfolgt (19-20). Die Mangelversorgungssituation in avaskulären Mikrotumoren wird zusätzlich durch die hohe Stoffwechselaktivität proliferierender neoplastischer Zellen verstärkt. Erst nachdem Kapillaren aus bereits vorhandenen Blutgefäßen in die Tumorzellverbände eingesprossen sind (Tumorangiogenese), beginnt die exponentielle Wachstumsphase des Primärtumors (21). Aufgrund des irregulären Tumorwachstums bauen sich weitere Diffusionsgradienten bezüglich der Sauerstoff-, Metabolit-/Katabolit- und Nährstoffkonzentrationen zwischen vaskularisierten und gefäßfernen, avaskulären Tumorbereichen auf. Diese führen zu einer erhöhten Proliferationsrate neoplastischer Zellen in gefäßproximalen Bereichen, während in gefäßperipheren Tumorarealen durch den Verlust der zellulären Homöostase häufig eine massiv erhöhte Zelltodrate beobachtet wird (22, 23). Der Tumorprogression mit der Entstehung vaskularisierter Karzinome und dem malignen, metastastasierendem Tumorwachstum gehen weitere Abberationen voraus. Beispielsweise induzieren Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen die Expression von HIF-1 α Protein (*Hypoxia Inducible Factor*), welches nach Dimerisierung mit HIF-1 β einen aktiven Transkriptionsfaktor bildet, der pleiotrop verschiedene Genkaskaden aktiviert, deren Genprodukte zu einer verbesserten Energieversorgung unter Sauerstoffmangelbedingungen beitragen (24-26). Die vom HIF-1 α /HIF-1 β Komplex induzierten Gene kodieren unter anderem für Enzyme des anaeroben Glucosestoffwechsels (z.B. Lactatdehydrogenase und Aldolase), Glucosetransporter (GLUT-1, -2, -3), endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), sowie für vasodilatorische Faktoren (Endothelin-1) (27-29).

Die Tumorangiogenese fördert neben dem An- und Abtransport von Biomolekülen auch die Metastasierung von Tumorzellen in entfernte Gewebe des Körpers (30, 31). Durch Infiltration von Blutgefäßen oder Lymphabflüssen und Loslösung einzelner Zellen aus dem Primärtumorgewebe gelangen die Tumorzellen in die Blutbahn, was den ersten Schritt zur Metastasierung darstellt. Um in der Blutbahn überleben zu können, müssen Apoptose-Signalwege in adhären Tumorzellen nach Kontaktverlust zu Substratoberflächen unterdrückt werden (32). In etwa 90 % aller Karzinome bilden sich Fernmetastasen in denjenigen Kapillargebieten, in die Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen (33). Dort durchdringen Tumorzellen das Endothel mit der endothelialen Basalmembran, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das gesamte Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen aus (34). Der malignen Tumorprogression liegen extrem komplexe phänotypische Veränderungen in den Tumorzellen zugrunde, die Abberationen

auf Ebene der DNA, der Transkription und Translation sowie posttranslatorische Veränderungen umfassen. Änderungen der Genexpression in Tumorzellen beruhen dabei häufig auf der Deregulierung epigenetischer Mechanismen der Transkriptionskontrolle z.B. einer Methylierung des Promotors oder einer verdichteten Chromatinstruktur in regulatorischen Genbereichen (36, 37). Neben weiteren Faktoren kommt in der Tumorphprogression dem Expressionsverlust des CD95/Fas/APO-1-Rezeptors für die Unterdrückung von Apoptosesignalen, die erhöhte oder erniedrigte Expression von Zelladhäsionsmolekülen ($\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, ICAM-1, E-Cadherin) für ein hohes invasives Wachstumspotential sowie der Sekretion von Serin- und Matrix-Metalloproteinasen (uPA-System, Matrilysin) für die Degradation der extrazellulären Matrix eine wichtige Bedeutung zu (37-42).

2.2 Organisation epithelialer Zellverbände

Die geordnete Struktur normaler Epithelgewebe mit der Ausbildung einer apikal-basolateralen Polaritätsachse in Epithelzellen basiert auf komplexen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sowie der Kopplung epithelialer Zellen über das intrazelluläre Zytoskelett (43). Die Ausbildung der Zellpolarität in Epithelzellen mit der korrekten Ausrichtung von membranständigen Rezeptoren sowie Transporterproteinen ist eine wichtige Voraussetzung für die Funktion von Epithelien als selektive Permeabilitätsbarriere von Molekülen zwischen physiologisch unterschiedlichen Kompartimenten (z.B. Nährstoffabsorption im Darm, Filtration in der Niere oder Sekretion in den Milchdrüsen). Bei der Entwicklung der Polarität von Epithelzellen spielen die Ausbildung einer Zell-Zell Adhäsion zwischen benachbarten Zellen sowie die Anheftung an die extrazelluläre Matrix eine wesentliche Rolle. Neben der Restrukturierung des Zytoskeletts entlang der Zelladhäsionsbereiche und Neupositionierung von Zellorganellen (z.B. Nukleus, Golgi-Apparat) kommt es zur Polarisierung der Zellmembran mit der Bildung von apikalen und basolateralen Plasmamembranzonen. Diese weisen distinkte definierte Proteinzusammensetzungen auf (44-47). Die unterschiedliche Proteinverteilung der beiden Membrandomänen stellt eine Voraussetzung für gerichtete physiologische Transportvorgänge (z.B. Transzytose) über epitheliale Zellschichten dar (48).

Die apikal-basolaterale Polaritätsachse epithelialer Zellen wird durch laterale Zell-Zell- und basolaterale Zell-Matrix-Kontakte aufrechterhalten. Integrine bilden im Wesentlichen die adhäsiven Bestandteile der basolateral gelegenen Hemidesmosomen und Fokalkontakten. Durch Interaktion der extrazellulären Rezeptordomänen von Integrinen mit Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin, Proteoglykanen) werden Verankerungspunkte zwischen Stromagewebe und Basalmembran einerseits und intrazellulär assoziierten Aktin- bzw. Interme-

diärfilamenten andererseits hergestellt (49). Bei den Zell-Zell-Kontakten unterscheidet man zwischen Desmosomen (Macula adherens), Adherens Junctions (Zonula adherens), Tight Junctions (Zonula occludens) und Gap Junctions. Desmosomen, Adherens Junctions und Tight Junctions werden aufgrund ihrer strukturellen Nähe an Zellkontaktstellen zu einer Einheit zusammenfasst und als junctionaler Komplex (Verbindungskomplex) bezeichnet (50). Gap Junctions sind Kanäle aus Connexin-Hexameren, die primär eine interzelluläre Kommunikation durch ionale und metabolische Koppplung benachbarter Zellen ermöglichen und nur sekundär der Zell-Zell-Adhäsion dienen (51, 52).

Die wesentlichen Adhärenzverbindungen zwischen epithelialen Zellen stellen die Adherens Junctions und die Desmosomen dar. Die Adhäsionsmoleküle beider Strukturen sind Proteine der Cadherinfamilie, deren extrazelluläre Domänen nach Bindung von Ca^{2+} homophile, ionische Bindung zu Cadherinen der Nachbarzellen eingehen (53-58). Desmogleine und Desmocolline sind Mitglieder der Cadherin-Superfamilie und die wesentlichen Adhäsionsproteine der Desmosomen (59). Desmosomen bilden punktförmige Zell-Zellkontakte und weisen eine intrazelluläre Plaque-Struktur bestehend aus membrangebundenen Proteinen auf, an denen Intermediärfilamente assoziiert sind (60). Adherens Junctions, die im junctionalen Komplex zwischen Desmosomen und Tight Junctions lokalisiert sind, bilden in Epithelzellen einen Adhäsionsgürtel, der neben Cadherinen (Uvomorulin, L-CAM, A-CAM) aus einer Vielzahl intrazellulär gebundener Proteine (α - β -Catenine, α -Aktinin, ZO-1) sowie dem kortikal assoziierten Aktinfilament-Zytoskelett aufgebaut ist (61-65). Tight Junctions bilden die am weitesten apikal gelegenen Zell-Zellkontakte polarisierter Epithelzellen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Tight Junctions als Verschmelzungspunkte („kissing“ points) der Plasmamembranen benachbarter Zellen, die den Interzellulärraum über den gesamten Zell-Zellkontaktbereich komplett verschließen (66). In Gefrierbruch-Analysen konnte gezeigt werden, daß dieser enge Zusammenschluß durch integrale Membranpartikel gewährleistet wird, die in verzweigten filamentösen Strukturen in der Plasmamembran angeordnet sind (67). Die molekulare Struktur von Tight Junctions bewirken einerseits die selektive Abdichtung des parazellulären Raumes in epithelialen und endothelialen Zellschichten (barrier function) und andererseits eine Inhibition der freien Diffusion von Membranproteinen und Lipiden in der Zellmembran (fence function). Letzteres ist eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der zellulären Polaritätsachse mit einer apikalen und basolateralen Membrandomäne (50).

2.3 Struktur und Funktion Tight Junction assoziierter Proteine

Obwohl die genaue molekulare Struktur von Tight Junctions bis heute nicht bekannt ist, deuten neuere Ergebnisse darauf hin, daß Tight Junctions Multiproteinkomplexe sind, an deren Aufbau Transmembranproteine, Adaptorproteine, regulatorische Proteine und transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulatoren beteiligt sind (68). Die bisher identifizierten integralen Membranproteinbestandteile von Tight Junctions werden in Proteine der Immunglobulin-Superfamilie und Proteine mit vier Transmembrandomänen eingeteilt (68). Die letztere Gruppe umfasst Mitglieder der Claudin-Familie und Occludin, die trotz struktureller Ähnlichkeiten mit jeweils vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Loop-Regionen zum Teil nur geringe Sequenzhomologien zueinander aufweisen (69). JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) und CAR (*coxsackie- and adenovirus receptor*) sind die beiden Vertreter Tight Junction assoziierter Proteine mit Immunglobulin-Domänen (70, 71). Obwohl die genaue Funktion von JAM und CAR in Tight Junction Komplexen noch unbekannt ist, konnte gezeigt werden, daß beide Moleküle die Barrierefunktion von Tight Junctions beeinflussen (72, 73). Occludin wurde 1993 als erste integrale Membranprotein-Komponente von Tight Junctions beschrieben (74). In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, daß Occludin in Tight Junction Filamenten lokalisiert ist, allerdings konnte dessen Funktion für die Abdichtung des Interzellularraumes in Epi- und Endothelien noch nicht sicher geklärt werden (66). Eine generelle Bedeutung von Occludin für Aufbau und Funktion von Tight Junctions wird jedoch durch mehrere Versuchsergebnisse in Frage gestellt. So wiesen einerseits Occludin-defiziente embryonale Stammzellen und Occludin knock-out Mäuse noch gut ausgebildete Tight Junctions auf, andererseits führte die Überexpression von Occludin in per se Tight Junction negativen Maus L-Fibroblasten lediglich zur Ausbildung kurzer, diskontinuierlicher Tight Junction Strukturen (69, 75, 76). Furuse et al. konnten 1998 zwei weitere Komponenten des Tight Junction Komplexes in Hühnerleberextrakten durch Peptidsequenzierung identifizieren, die als Claudin-1 und -2 bezeichnet wurden (69). Nachfolgende Analysen von Sequenzdatenbanken und cDNA-Bibliotheken ergaben, daß es sich bei den Claudinen um eine Proteinfamilie handelt, der bisher aufgrund von Sequenzhomologien 24 Mitglieder zugeordnet werden konnten (50, 77). Hydrophobizitätsanalysen zeigten außerdem, daß alle bekannten Claudine für Proteine mit vier Transmembranregionen und zwei unterschiedlich großen extrazellulären Loop-Regionen kodieren, die eine Reihe von konservierten und geladenen Aminosäure-Resten aufweisen. Der kurze intrazelluläre C-Terminus besitzt eine als PDZ-Bindemotiv bezeichnete hochkonservierte Aminosäure-Sequenz, welches für die Rekrutierung zytoplasmatischer Plaque-Proteine mit PDZ-Domänen an den Tight Junction Komplex von Bedeutung ist (78-80).

Mitglieder der Claudin-Familie weisen 30 bis 70 % Sequenzidentität auf und zeigen eine differentielle mRNA Expression in verschiedenen Geweben. So findet man Claudin-1 in stark abdichtenden Epithelgeweben exprimiert (z.B. Haut, distaler Nierentubulus, Colon, Prostata, Leber, Pancreas, Placenta), während Claudin-2 vor allem in durchlässigen Epithelien detektiert werden konnte (z.B. distaler Nierentubulus, Plexus choroidei, Lunge, Dünndarm) (81-83). Claudin-5 wurde ubiquitär in allen untersuchten Geweben gefunden und nachfolgend als Endothel-spezifisches Tight Junction Protein identifiziert (84). In den meisten untersuchten Epithelien konnte eine Expression verschiedener Claudine nachgewiesen werden, z. B. im Brust- (Claudin-1, -4, -7, -8), Lungen- (Claudin-2, -3, -4, -7, -8, -18) oder Dickdarmgewebe (Claudin-1, -3, -4, -7, -8, -11) (81). Claudin-3, -4 und -11 wurden bereits vor der Beschreibung der Claudin-Superfamilie identifiziert, weshalb alternative Name existieren: RVP-1 (Rat Ventrale Prostate, Claudin-3) (85), CPE-R (Clostridium Perfringens Enterotoxin Rezeptor, Claudin-4) (86) und OSP-1 (Oligodendrozyten spezifisches Protein, Claudin-11) (87) bezeichnet. Der alternative Name CPE-R für Claudin-4 beruht auf der Entdeckung, daß Claudin-4 (und Claudin -3) eine Bindungsaffinität zum Enterotoxin-Protein des humanpathogenen Bakteriums Clostridium Perfringens aufweisen, welche als Ursache für die nach einer Infektion auftretende gastro-intestinale Dysfunktion diskutiert wird (88).

Aufgrund von Expressions- und Funktionsanalysen geht man derzeit davon aus, daß Claudine durch homo- und heterophile Interaktionen das strukturelle und funktionelle Rückgrat von Tight Junctions bilden (89). Nach Expression verschiedener Mitglieder der Claudin-Familie in murinen L-Fibroblasten konnte beispielsweise in EM-Untersuchungen die Bildung Tight Junction ähnlicher Strukturen an Zell-Zellkontakten beobachtet werden. Während die Expression von Claudin-1 und -3 zur Ausbildung kontinuierlicher Strangstrukturen führte, wiesen Claudin-2 und -5 positive Maus L-Fibroblasten lediglich diskontinuierliche, partikuläre Filamente in der Plasmamembran auf (84, 90). Die Cotransfektion verschiedener Claudine führte außerdem je nach Kombination zur Copolymerisation in Tight Junction Filamenten, wobei eine Bindungsfähigkeit von Claudin-3 mit Claudin-1 und Claudin-2, nicht aber von Claudin-1 mit Claudin-2 festgestellt wurde (89). Weitere in vitro Studien weisen auf die Bedeutung der Interaktion verschiedener Claudine sowie deren individuelle Funktion bei der Aufrechterhaltung der Tight Junction Diffusionsbarriere hin. So korrelierten die Proteinmengen von Claudin-4 und Claudin-8 in MDCK Zellen (*madine-darby canine kidney*) nach artifizieller Überexpression mit einer selektiven Inhibition der Permeabilität von Na⁺-Ionen, während im Gegensatz dazu die Expression von Claudin-2 im gleichen Zellmodell zu einer erhöhten Durchlässigkeit positiv und negativ geladener Ionen sowie der Ausbildung unvollständiger Tight Junction Strukturen führte (91-93).

Die allgemeine Bedeutung von Claudin-1 für die Barrierefunktion epithelialer Zellschichten konnte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Studien eindrucksvoll dokumentiert werden. Während McCarthy et al. nach Expression von murinem Claudin-1 in MDCK Zellen mit der Messung einer erniedrigten parazellulären Ionen-Fluxrate bei gleichzeitig erhöhter Diffusionsrate ungeladener Moleküle (Mannitol, 4 kD und 10 kD Dextran) widersprüchliche Ergebnisse lieferten, konnten Inai et al. nach Transfektion von MDCK Zellen mit Myc-Tag markiertem Claudin-1 sowohl eine Flux-Inhibition von Ionen als auch von ungeladenen Molekülen (4 kD und 40 kD Dextran) messen (94, 95). Desweiteren wurde berichtet, daß transgene Claudin-1 knock-out-Mäuse im Gegensatz zu Occludin-defizienten Mäusen nicht überlebensfähig waren und innerhalb eines Tages nach der Geburt verstarben. Diese Tiere zeigten phänotypische Veränderungen der Haut mit einer abnormen Faltenbildung und einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust, was auf eine wichtige Rolle von Claudin-1 für die Abdichtungsfunktion der Epidermis hindeutet. Funktionelle Studien an diesem Modell konnten außerdem zeigen, daß trotz Anwesenheit von Occludin und Claudin-4 der Expressionsverlust von Claudin-1 neben einer Erhöhung der transepidermalen Wasserpassage zu einer Zunahme der Diffusion subkutan injizierter Markermoleküle (~600 D) führt (96, 97).

Die Bedeutung von Claudinen für die selektive Ionenpermeabilität von Epithelien wird auch durch die Identifizierung von Mutationen in Claudin-Genen als Ursache monogenetischer Erkrankungen belegt. Durch positionelle Klonierung wurden Punktmutationen im Claudin-16/Paracellin-1 Gen identifiziert, die bei Patienten mit familiärer Hypomagnesiämie nachgewiesen werden können. Claudin-16 wird spezifisch im aufsteigenden Tubulus der Henle'schen Schleife exprimiert, wo die Rückresorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} -Ionen aus dem Primärharn stattfindet. Man geht davon aus, daß Claudin-16 porenähnliche Strukturen im Interzellulärraum des Nephronepithels bildet, die eine selektive Durchlässigkeit bivalenter Kationen ermöglichen (98). Ebenso wurde eine Mutation im Claudin-14 Gen mit der erblichen Taubheit in Verbindung gebracht. Claudin-14 wird in der Cochlea des Innenohres spezifisch in der Epithelzellschicht exprimiert, die Endo- und Perilymphe voneinander abtrennt und für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten zwischen beiden Kompartimenten sorgt. Letzteres ist die Voraussetzung für die Erregbarkeit der Haarzellen und der Reizweiterleitung akustischer Signale zum Gehirn (99).

Die intrazellulär an Tight Junctions assoziierten Moleküle lassen sich in Proteine ohne und mit PDZ-Domänen (PDZ) unterteilen. Bei letzterer Gruppe handelt es sich vorwiegend um Adaptorproteine, die Verknüpfungspunkte zwischen transmembranösen Tight Junction Komponenten einerseits und zytoskeletalen sowie regulatorischen Proteinen andererseits herstellen (68).

Die aus 80-90 Aminosäure-Resten bestehenden PDZ-Domänen zeigen eine Bindungsaffinität zu anderen PDZ-Domänen oder zu C-terminal konservierten Sequenzmotiven (PDZ-Bindemotiv), welche unter anderem in Claudinen vorkommen (100). So konnte gezeigt werden, daß die MAGUK-Proteine (*membrane associated guanylate Kinase*) ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (*Zonula occludens*), die jeweils 3 PDZ-Domänen besitzen, eine Bindungsfähigkeit untereinander und mit den C-terminalen PDZ-Bindemotiven von Claudin-1 und -2 aufweisen (78). Außerdem wurde für alle drei ZO-Proteine eine PDZ-unabhängige Interaktion mit Occludin beschrieben (101-103). ZO-Proteine können direkt cytoskeletales F-Aktin binden sowie mit weiteren Faktoren wie Cingulin und AF-6 interagieren, die ebenfalls Aktin-Bindedomänen besitzen und eine indirekte Anknüpfung von Tight Junction Komplexen an das Aktomyosin-Zytoskelett ermöglichen (101, 104, 105). Neuere Untersuchungen führten zur Identifizierung weiterer Tight Junction assoziierter Proteine mit multiplen PDZ-Domänen wie z.B. die MAGI-Proteine (*MAGUK inverted proteins*), die PAR-Proteine (*partitioning-defective proteins*), MUPP-1 (*multi-PDZ domain protein 1*), oder PATJ (*Pals1 associated tight junctions protein*) (80, 106-108). Bindungsstudien deuten darauf hin, daß diese Moleküle wie die MAGUKs einerseits mit transmembranösen Tight Junction Komponenten, PDZ-Domänen Proteinen sowie mit Adaptoren und Bestandteilen des kortikalen Zytoskeletts interagieren können, aber andererseits auch Faktoren binden, die an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt sind (66). Zu dieser Gruppe Tight Junction assoziierter Proteine ohne PDZ-Domäne gehören unter anderem heterotrimere G-Proteine, kleine GTP-bindende Proteine (Rab13, Rab3B), Proteinkinasen (PKC λ , ζ), Phosphatasen (PTEN) und Transkriptionsfaktoren (ZONAB) (109-113). Es wird diskutiert, daß die Assoziation dieser Faktoren mit Tight Junction Komplexen für die Steuerung wichtiger zellulärer Prozesse wie der Kontaktinhibition, dem Vesikeltransport, der Aufrechterhaltung der Zellpolarität, der Signaltransduktion sowie für die Regulation der Tight Junction Diffusionsbarriere von Bedeutung sind (66, 68).

2.4 Regulation der Tight Junction Barrierefunktion

In vitro Untersuchungen der Mechanismen, welche für die Regulation der Tight Junction Barrierefunktion verantwortlich sind, ergaben eine Beteiligung diverser Signalwege an der Steuerung von Expression und Lokalisation Tight Junction assoziierter Moleküle. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, daß zelltypabhängig verschiedene Wachstumsfaktoren und Moleküle mit hormonartiger Wirkung (Retinoide, Cytokine, TGF β , Steroide), second Messenger (Ca²⁺, cAMP) und Komponenten diverser intrazellulärer Signalkaskaden (Ras, RhoA, Rac1, PKA, PKC, heterotrimere G-Proteine) eine Rolle für die Expression oder Lokalisation von Tight Junction Molekülen spielen (113-127). Retinoide sind an vielen physiologischen Prozessen

beteiligt, so z.B. auch an der Zelldifferenzierung in verschiedenen epithelialen Gewebeverbänden. Natürliche Retinoide wie all-trans Retinsäure (t-RA) vermitteln ihre Funktion als Liganden nukleärer Transkriptionsfaktoren, die als Retinsäure-Rezeptoren (*Retinoic Acid Receptors*, RAR) und Retinoid X Rezeptoren (*Retinoid X Receptors*, RXR) bezeichnet werden und jeweils in drei Unterformen (α , β , γ) vorkommen (128). Einen Einfluss von t-RA auf die parazelluläre Permeabilitätsbarriere wurde von Gorodeski et al. an humanen zervikalen Epithelzellen (CaSki) und von Tobioka et al. an einer primären Mesothel-Zellkultur gezeigt (129, 130). Außerdem konnten Kubota et al. in Genexpressionsanalysen nach t-RA-Behandlung in murinen F9 embryonalen Karzinomzellen eine Aktivierung der Transkription Tight Junction assoziierter Moleküle beobachten. So wurden Occludin, ZO-1, Claudin-2, -6 und -7 mRNA vermehrt exprimiert, während keine Induktion der Claudin-1, -3, -4, und -5 mRNA Expression festgestellt werden konnte (131). Die erhöhte Expression von Tight Junction Molekülen führte gleichzeitig zu einer Reduktion der parazellulären Molekülpermeabilität.

Unabhängig von der Beteiligung nukleärer Retinoid-Rezeptoren demonstrieren mehrere Studien die Bedeutung des Ras-MEK-ERK Signaltransduktionswegs für die Regulation von Tight Junction Molekülen. Chen et al. konnten zeigen, daß Ha-Ras transformierte MDCK-Zellen ein unphysiologisches zelluläres Homing von Claudin-1, Occludin und ZO-1 im Cytoplasma aufweisen. Nach Inhibition des MAPK-Signalweges mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 wurde eine Relokalisation aller drei Proteine an die Zytoplasmamembran verbunden mit der Ausbildung funktioneller Tight Junctions beobachtet. Trotz Änderung der zellulären Lokalisation konnte nach MEK-1 Inhibition kein Unterschied der Genexpression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 detektiert werden (127). In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde von Li et al. nach Expression einer onkogenen Version des Ras-Effektors Raf-1 in von Speicheldrüsenepithel der Ratte abgeleiteten Pa-4 Zellen neben einer Verringerung der Claudin-1 und Occludin Proteinmenge und einer zytoplasmatischen Lokalisation von ZO-1 auch ein Verlust der Tight Junction Diffusionsbarriere dokumentiert (132). Desweiteren berichteten Yamamoto et al., daß die Überexpression von Ras in Rat1 Fibroblasten zu einer Reduktion der Zell-Zellkontakte und einer Abnahme von ZO-1 und AF-6 an der Zelloberfläche führt (133). Schließlich wurde im Widerspruch zu diesen Ergebnissen auch gezeigt, daß die Inhibition des MAPK Signalwegs die Entwicklung funktioneller Tight Junctions blockieren kann, wie Kinugasa et al. an Interleukin-17 behandelten humanen intestinalen T84 Epithelzellen beobachtete (134). Häufig korreliert ein Verlust der epithelialen Differenzierung in Tumorzellen mit einer konstitutiven Aktivierung von Ras oder anderen Komponenten des Ras-Signalwegs (135). Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, daß der Ras-MEK-ERK Signalweg neben der Fehlsteuerung von Zellproliferation

und Apoptose möglicherweise auch an einer Dysregulation der Tight Junction Funktion in Tumoren beteiligt ist.

2.5 Verlust der Tight Junction Barrierefunktion in der Tumorgenese

Eine Reihe histomorphologischer und molekulargenetischer Studien deuten darauf hin, daß der Verlust der Tight Junction Barrierefunktion bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen im Körper eine Rolle spielt. Dazu zählen neben Erbkrankheiten wie der familiären Hypomagnesämie und der angeborenen Taubheit Veränderungen des Gefäßsystems (z.B. Ödembildung bei Entzündungsreaktionen, diabetische Retinopathie), Erkrankungen des gastrointestinalen und respiratorischen Traktes (z.B. bakterielle Darminfektionen, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Asthma), Leberfunktionsstörungen (z.B. Ikterus, Leberzirrhose) oder virale Infektionen (z.B. Adenovirus, HIV) (98, 99, 136-145). Die Auflösung funktioneller Tight Junction Strukturen führt dabei zur Öffnung parazellulärer Räume mit dem Ausgleich von Stoffgradienten zwischen unterschiedlichen Kompartimenten oder ermöglicht bei Infektionskrankheiten das Eindringen pathogener Keime oder Toxine in das interstitielle Gewebe (87).

Der Verlust der Tight Junction Barrierefunktion in Zellen epi- und endothelialen Ursprungs wird auch mit der Entstehung von malignen Tumoren sowie der Metastasierung in Verbindung gebracht (87, 146). In vitro Studien an LLC-PK₁ Zellen konnten beispielsweise zeigen, daß die Behandlung epithelialer Zellschichten mit dem Mitogen TPA zu einer 35-fach höheren parazellulären Diffusionsrate des Wachstumsfaktors EGF führt (147). Aufgrund dieses und anderer Befunde wurde von James Mullin postuliert, daß der Verlust der parazellulären Diffusionsbarriere und der Zellpolarität nach Einwirkung von Tumorpromotoren zu einer besseren Zugänglichkeit apikaler Wachstumsfaktoren an die normalerweise ausschließlich basolateral gelegene Rezeptoren führt und somit die Entstehung von Tumoren durch eine gesteigerte Zellproliferation begünstigt (148, 149). Tatsächlich konnte der Verlust normaler Tight Junction Strukturen sowie eine veränderte Expression Tight Junction assoziierter Moleküle in verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen werden. Bereits vor über 20 Jahren wurden in tierexperimentellen Studien an Hunden und Mäusen veränderte Tight Junction Strukturen in induzierten Blasen- und Brusttumoren festgestellt (150, 151). Mit Hilfe der Gefrierbruch-Technik gelang es desweiteren, differenzierte von stark dedifferenzierten humanen Darm-, Thyroid- und hepatozellulären Tumoren anhand ihrer Tight Junction Strukturen zu unterscheiden. Während hochdifferenzierte Tumore kontinuierliche und in mehreren Reihen angeordnete Tight Junction Strangstrukturen aufwiesen, wurden in dedifferenzierten und infiltrierenden Karzinomen lediglich Ansätze von Tight Junction Strängen mit diskontinuierlichen Linienstrukturen identifiziert (152-154).

Schließlich konnte der Funktionsverlust von Tight Junctions in humanen Colonkarzinomen eindrucksvoll von Soler et al. demonstriert werden, indem sie eine Penetration elektronendichter Markermoleküle in die interzellulären Räume von Karzinomzellen des Darmes beobachteten (155).

Auch eine veränderte Expression Tight Junction assoziierter Proteine korreliert mit der in-vivo Progression maligner Tumore. So wurde in immunhistochemischen Studien ein hohes Expressionsniveau von ZO-1 in normalem Brustdrüsenepithel gefunden, während 69 % aller untersuchten Brusttumorgewebe reduzierte ZO-1 Mengen zeigten. Nach einer genauen histologischen Untersuchung konnte festgestellt werden, daß in 42 % aller gut differenzierten, 83 % aller mäßig differenzierten und 93 % aller wenig differenzierten dukalen Karzinome eine Reduktion der ZO-1 Expression vorlag (156). Ein ähnlicher Befund wurde beim Vergleich von Normalgewebe mit Tumoren des Verdauungstraktes erhalten. In gut differenzierten Adenokarzinomzellen konnten ZO-1 und Occludin ebenso wie in normalen Zylinderepithelzellen entlang eines definierten Bereich an apikalen Zell-Zellkontakten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine reduzierte Expression beider Proteine in Tumorzellen von wenig differenzierten Adenokarzinomen gefunden, wobei eine signifikante Korrelation des Differenzierungsgrades der Tumorzellen und der Expression von ZO-1 und Occludin feststellbar war (157). Schließlich konnte ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsverlust des ZO-1 homologen Protein *dlg* (*discs large*) und der Tumorbildung in Imaginalscheiben bei *Drosophila* gefunden werden (158).

Neuere Analysen der mRNA oder Proteinexpression verschiedener Claudine in humanen Tumorzelllinien sowie soliden Tumoren im Vergleich zu normalen Zellen lassen ein uneinheitliches Muster der Regulation in der Tumorgenese erkennen. So konnte eine Reduktion der Expression von Claudin-1 in verschiedenen Brusttumorzelllinien (159, 160), von Claudin-7 in Brust- und Kopftumoren (161, 162) und von Claudin-23 in Magenkarzinomen (163) festgestellt werden, während eine signifikant erhöhte Expression von Claudin-1 in Colonkarzinomen (164) sowie von Claudin-3 und -4 in Prostata- und Ovarialkarzinomen detektiert wurde (165, 166). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte jeweils eine unphysiologische cytoplasmatische zelluläre Verteilung von Claudin-1, -3 und -4 in überexprimierenden Tumorgeweben nachgewiesen werden. Obwohl die Bedeutung der Überexpression von Claudinen in Tumoren noch völlig unklar ist, wird ein dominant negativer Effekt auf die Bildung funktioneller Tight Junctions diskutiert. Somit hätte sowohl die reduzierte als auch die vermehrte Expression von Claudinen einen Verlust der Tight Junction Barrierefunktion zur Folge. Diese Hypothese wird durch den Befund gestützt, daß die Überexpression von Claudin-2 in MDCK Zellen zu einer

Erhöhung der parazellulären Fluxrate führt (91). Gleichzeitig wurde von Rangel et al. nachgewiesen, daß Claudin-3 und -4 positive Ovarialkarzinomzelllinien keine funktionellen Tight Junctions aufweisen (165).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der physiologischen Bedeutung und Regulation des humanen Claudin-1 in der Brusttumorgenese. Die Gensequenz von humanem Claudin-1 wurde mit Hilfe der Differential Display Technik durch Vergleich der mRNA Expression exponentiell wachsender normal diploider Brustepithelzellen und seneszenten Brustepithelzellen gefunden, weshalb Claudin-1 vor der Beschreibung der Claudin-Familie als SEMP1 (Senescence-associated epithelial membrane protein) bezeichnet wurde (159). Hierbei wurde nachgewiesen, daß die Claudin-1 mRNA in seneszenten im Vergleich zu proliferierenden Brustepithelzellen deutlich überexprimiert war. Nach Klonierung der differentiell exprimierten 320 bp cDNA Bande wurde in Northern Blot Analysen desweiteren gezeigt, daß das Transkript in einer Reihe dedifferenzierter humaner Brusttumorzellen nicht mehr nachzuweisen war. Expressionsanalysen auf multiplen Northern Blots ergaben zudem eine ausschließlich epitheliale Gewebelokalisation, wobei Claudin-1 mRNA in absteigender Intensität in Leber, Prostata, Pankreas, Ovarien, Hoden, Plazenta, Thymus und Lunge detektierbar war. Durch Screening einer cDNA-Genbank seneszenten menschlicher Brustzellen konnte die komplette kodierende Sequenz von humanem Claudin-1 ermittelt werden. Der offene Leserahmen der Gensequenz weist eine Größe von 633 bp auf und kodiert für ein aus 211 Aminosäuren aufgebautes Protein, das eine Sequenzhomologie von 91 % zum murinen Claudin-1 Protein besitzt. Wie bei allen Claudinen handelt es sich bei Claudin-1 um ein integrales Membranprotein mit 4-Transmembrandomänen und jeweils 2 extrazellulären (1, 3) bzw. 2 intrazellulären Domänen (2, 4). Neben einer putativen Asparagin N-Glykosilierungsstelle an Position 72 in der Domäne 1 weist die Proteinsequenz in der intrazellulären Domäne 4 ein C-terminales PDZ-Bindemotiv (DYV), eine prolinreiche Region sowie einen Tyrosin-Rest an Position 192 als potentielle Phosphorylierungsstelle auf. Um mögliche genetische Ursachen für den Expressionsverlust von Claudin-1 in Brusttumorzellen zu identifizieren, wurden die Promotorregion sowie die Intron- und Exon-Bereiche des Claudin-1 Gens charakterisiert und hinsichtlich mutagener Veränderungen in 96 Patientinnen mit spontanen Brusttumoren, 93 Patientinnen mit Brusttumoren und familiärer Prädisposition sowie in 11 Brusttumorzelllinien untersucht (167). Sowohl in den vier kodierenden Exons, den drei Introns und den 5' bzw. 3' untranslatierten Regionen (UTR) des Claudin-1 Gens konnten keine Mutationen identifiziert werden, die einen Verlust der Claudin-1 Expression erklären würden. Das Fehlen genetischer Veränderungen spricht demnach für eine Beteiligung epigenetischer Faktoren am Verlust der Claudin-1 Expression in der Brusttumorgenese. Eine Untersuchung des Claudin-1 Promotor-

bereiches ergab eine Vielzahl theoretischer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem für den ubiquitären Transkriptionsfaktor SP-1, die mit 89 % Sequenzhomologie die einzige hochkonservierte Transkriptionsfaktorbindestelle zwischen der murinen und humanen Claudin-1 Promotorsequenz darstellt. Sowohl im murinen als auch im humanen 5' UTR Bereich des Claudin-1 Gens konnte ein kurzer GC-reicher Sequenzabschnitt (-450 bis -500 von ATG) identifiziert werden. Diese GC-reiche Region erfüllt die Kriterien einer putativen CpG Insel könnte und an der transkriptionellen Kontrolle der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen beteiligt sein.

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es einerseits, die zellphysiologische Bedeutung von Claudin-1 in der Tumorgenese zu analysieren und andererseits mögliche epigenetische Regulationsmechanismen zu identifizieren, die am Expressionsverlust von Claudin-1 in Brusttumorzellen beteiligt sind. Dazu sollte der Expressionsstatus von Claudin-1 sowie anderer relevanter Tight Junction Proteine in Korrelation zur Tight Junction Diffusionsbarriere in einer Reihe verschieden differenzierter Brusttumorzelllinien dargestellt werden. Um die zellphysiologische Relevanz des Claudin-1 Expressionsverlust zu charakterisieren, sollte der Effekt der Claudin-1 Reexpression in endogen Claudin-1 negativen Brusttumorzellen analysiert werden. Neben Untersuchung der Struktur und Funktion von Tight Junctions nach Claudin-1 Reexpression sollte der Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation und Zelltod von Brusttumorzellen in 2D und 3D Zellkulturen sowie in-vivo im Maus-Xenograft charakterisiert werden. Um Hinweise auf die Regulationsmechanismen der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen zu erhalten, sollten aktivatorische oder inhibitorische Substanzen möglicherweise beteiligter Signalkaskaden zur Anwendung kommen. So sollte die in der Literatur beschriebene Relevanz des Ras-Signaltransduktionswegs und nukleärer Retinoid-Rezeptoren sowie die Rolle der Chromatinstruktur und der Promotormethylierung für die Regulation der Claudin-1 Expression und anderer Tight Junction Moleküle in verschiedenen humanen Brusttumorzellmodellen überprüft werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Ausbettstation	Tissue-Tek, Niederlande
BD LSR	Becton Dickinson, San Jose, USA
Begasungsbrutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Casy TTC Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Dampfkochtopf Multi-Gourmet	Braun, Kronberg
Densitometer calibrated GS-800	Bio-Rad Lab., Hercules, USA
Diamantmesser	Diatome, Bienne, Schweiz
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt
Eindeckautomat	Tissue-Tek, Niederlande
Elektrophoreseapparatur	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammern	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ELISA Plattenlesegerät Spectra Fluor Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA Plattenlesegerät Image Spectra Rainbow	Tecan, Crailsheim
FACscan	Becton Dickinson, San Jose, USA
Filmentwickler Curix HAT 330-U	Agfa, Mortsel, Belgien
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
Gefrierätzanlage Cressington CFE 50	Cressington Ltd., Watford, England
IKA Schüttler, MTSH	Janke & Kunkel, Staufen
Image Spectra Rainbow	Tecan, Crailsheim
Immunfärbeautomat „Autostainer“	DAKO, Hamburg
Inkubator	Heraeus, Hanau
Kleinschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Knifemaker Modell 7800	LKB, Bromma, Schweden
Kühlbare Laborzentrifuge Hermle Z 513 K	Hermle AG, Gosheim
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss, Jena
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microliter Syringe	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikrotom	Leika, Bensheim
pH Meter inoLab	WTW, Wien

Pyramitom Modell 11800	LKB, Bromma, Schweden
RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Erlangen
Slow-Scan-CCD-Kamera Typ TEM1010	Tietz TVIPS GmbH, Gauting
Sterilwerkbank	BDK, Reutlingen
Stromversorgungseinheit PowerEase 500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Transmissionselektronenmikroskop LEO906E	Leo, Oberkochen
TEM CM12 Philips	Fei Co., Eindhoven, Niederlande
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trimmfräse TM 60	Reichert-Jung, Wien, Österreich
UV-Transilluminator UVT-20M	Herolab, Wiesloch
Waage Sartorius BP 2100	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Precitherm PFV	Clinicon International

3.1.2 Reagenzien

ABTS Tabletten + Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Annexin-V Fluos	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Äther	Merck, Darmstadt
BCA-200 Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
Beschleuniger DMP30	Fluka, Taufkirchen
Bleinitrat	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Casyton-Lösung	Schärfe-System, Reutlingen
ChemMate-Kit CM 5001	DAKO, Hamburg
Collagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAB Substrate Kit	Fluka, Taufkirchen
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
E-Gel Agarose 2 %	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Epon 812	Fluka, Taufkirchen

Epon Härter DDSA	Fluka, Taufkirchen
Epon Härter MNA	Fluka, Taufkirchen
Ethanol (z.A.)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FITC-markierte Dextran 3 kD, 40 kD	Molecular Probes, Eugene, USA
Fluorescein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd-Lsg., 3,8 % gepuffert	Merck, Darmstadt
Formvar 1595 E (Polyvinylformal)	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ , 30 % (Perhydrol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Histomount	Shandon, Frankfurt
HPMA	Merck, Darmstadt
Hyaluronidase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Methanol	JT Barker & Sons Ltd.,UK
Multimark Multi-Coloured Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natrium Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natrium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumzitat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl-Lösung, 0,9 %	Delta Pharma, Pfullingen
NaCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nonidet P40	Fluka, Taufkirchen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

NuPAGE LDS Probenpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE MES/MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Fluka, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS, 10 x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin-Streptomycin 500 x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pferdeserum (normal)	Vector, Burlingame, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-HEMA	Polysciences, Eppenheim
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Qiaquick PCR Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RiboGreen RNA Quantification Kit	Molecular Probes, Eugene
Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
RIPA Puffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNA Amplification Kit SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNase Zap	Ambion, Huntingdon
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 (mit NaHCO_3)	PAA Laboratories, Innsbruck
Sucrose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypan-Blau	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Unmasking solution pH 10.1 (10 x)	Biogenex, Hamburg
Vectastain ABC (Elite)-Avidin-Biotin Komplex	Vector, Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.3 Standardpuffer

PBS (pH 7.4)	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	4.3 mM
	KH ₂ PO ₄	1.4 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
TBST (pH 7.4)	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0.05 %
RIPA complete	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet P40	1 %
	Natrium Deoxycholat	0.5 %
	SDS	0.1 %
	1 Protease-Inhibitor Tablette pro 10 ml RIPA-Pufferlösung	
Mounting Medium (pH 7.4)	Glycerol	65 %
	H ₂ O	25 %
	PBS 10 x	10 %
Semi Dry Transfer Puffer (pH 8.3)	Tris	11.64 g
	Glycin	5.86 g
	SDS	0.8 g
	Methanol	400 ml
	H ₂ O	ad 2 l
DNA-Färbepuffer (pH 7.4)	Tris	100 mM
	NaCl	154 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgCl ₂	0.5 mM
	BSA	0.2 %
	Nonidet P40	0.1 %
	RNase	10 U/ml
	+ Propidium Iodid (PI) oder Hoechst 33258	10 µg/ml 5 µg/ml
Hämalaun nach Mayer	Zitronensäure	1 g
	Hämatoxylin	1 g
	NaI	0.2 g
	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	ad 1000 ml Aqua dest.	

Eosin-Lösung (1 %)	Eosin Eisessig ad 1000 ml Aqua dest.	10 g 1.5 ml
Bleizitrat nach Reynolds	Pb(NO ₃) ₂ Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) x 2H ₂ O ad 25 ml Aqua dest.	0.66 g 0.88 g
Zinklösung	Calciumacetat Zinkchlorid Zinkacetat Tris-HCl ad 1000 ml Aqua dest.	0.56 g 5.0 g 5.0 g 15.8 g

3.1.4 Antikörper

Alexa 488 konjugiertes Ziege anti Maus IgG	Molecular Probes, Eugene, USA
Biotin konjugiertes Pferd anti Maus IgG	Vector, Burlingame, USA
Biotin konjugiertes Kaninchen anti Ratte IgG	Vector, Burlingame, USA
CY3 konjugiertes Ziege anti Maus IgG	Dianova, Hamburg
FITC konjugiertes Ziege anti Maus IgG	Zymed, San Francisco, USA
FITC konjugiertes Maus anti ZO-1 IgG	Zymed, San Francisco, USA
Kaninchen anti Claudin-2 IgG	Zymed, San Francisco, USA
Kaninchen anti Claudin-3 IgG	Zymed, San Francisco, USA
Kaninchen anti acetyliertes Histon H4 IgG	Upstate Biotechnology, UK
Maus anti human Claudin-1 IgG	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Maus anti ZO-1 IgG	Zymed, San Francisco, USA
Maus anti Claudin-4 IgG	Zymed, San Francisco, USA
Maus anti Occludin IgG	Zymed, San Francisco, USA
Maus anti β-Aktin IgG	Abcam, Cambridge, UK
POD konjugiertes Ziege anti Kaninchen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ratte anti Maus CD34 IgG	Hycult Biotechnology, Niederlande

3.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried/München) hergestellt.

Claudin-1 FW	5'- CCC AGT GGA GGA TTT ACT CCT ATG -3'
Claudin-1REV	5'- AAG AAA TAT CGC GCC CCC AAT G -3'
Claudin-3 FW	5'- AGG ACT ACG TCT AAG GGA CAG AC-3'
Claudin-3 REV	5'- ACA GTC CAT GCA GGT TGG-3'
Claudin-4 FW	5'-CAC TCT GCG AAC GTT AAG TC -3'
Claudin-4 REV	5'-GTA CAC CTT GCA CTG CAT CT-3'
Occludin FW	5'-CTT CCT ATA AAT CCA CGC CG -3'
Occludin REV	5'-GGC CAG TGT CAA AAT TCC TC -3'
ZO-1 FW	5'- CCG AGG AAA TGA TGA GGC AG-3'
ZO-1 REV	5'-GAT TAT CAA AAG GTG GCC GAG -3'
GAPDH FW	5'- TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA -3'
GAPDH REV	5'- TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT -3'

3.1.6 Niedermolekulare Wirksubstanzen

PD 98059	MEK-1 Inhibitor	Calbiochem, Luzern, Schweiz
CI-994	HDAC-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH
SAHA	HDAC-Inhibitor	“ “ “
MS-275	HDAC-Inhibitor	“ “ “
Trichostatin (TSA)	HDAC-Inhibitor	“ “ “
Retinoid 1 (t-RA)	RAR-Panagonist	“ “ “
Retinoid 2 (3 -cis RA)	RAR-Panagonist	“ “ “
Retinoid 3 (Arotinoid)	RAR-Panagonist	“ “ “
Retinoid 4 (9-cis RA)	RAR/RXR-Panagonist	“ “ “
Retinoid 5	RAR-alpha Agonist	“ “ “
Retinoid 6	RAR-alpha-Antagonist	“ “ “
Retinoid 7	RAR-beta Agonist	“ “ “
Retinoid 8	RAR-gamma Agonist	“ “ “
Retinoid 9	RAR-gamma-Agonist	“ “ “
Retinoid 10 (Targretin)	RXR-alpha/gamma Agonist	“ “ “
Retinoid 11	RXR- alpha/gamma Antagonist	“ “ “

3.1.7 Zelllinien

Zellmodelle	Beschreibung	Herkunft
HMEC	Normales Brustepithel	Clonetics
MCF-7	Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB 22
MCF-7 ADR	Adenocarcinom (Brust)	Balcer-Kubiczek et al. (168)
MDA-MB-231	Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB 26
MDA-MB-231 BAG	Adenocarcinom (Brust)	Holst-Hansen et al. (169)
MDA-MB-361	Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB 27
MDA-MB-435	Ductales Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB
SK-BR-3	Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB 30
T47-D	Ductales Adenocarcinom (Brust)	ATCC HTB133

3.1.8 Zellkulturbedarf

Biocoat Culture Slides, Collagen I	BD Falcon, Heidelberg
Cell Culture Cluster (6, 24, 96 Well)	Corning Inc. Costar, Wiesbaden
Cell Culture Insert 0.4 µm Porengröße	BD Falcon, Heidelberg
Cell Scraper	Corning Inc. Costar, Wiesbaden
Cryo 1°C Einfriercontainer	Nalgene, NY, USA
Einfrierröhrchen, 1.8 ml	Nalgene, NY, USA
MEBM Medium	Clonetics, San Diego, USA
MEGM BulletKit	Clonetics, San Diego, USA
RPMI 1640 (mit NaHCO ₃)	PAA Laboratories GmbH, Innsbruck
Transwell-Clear 0,4 µm Porengröße	Corning Inc. Costar, Wiesbaden
Zellkulturflaschen, T25, T75, T175	BD Falcon, Heidelberg

3.1.9 Materialien

Criterion Size Blotting Papier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DAKO Pen	DAKO, Hamburg
Eindeckgläser 24 x 60 mm	Diagonal, Münster
Einmalspritzen (1ml)	Braun, Kronberg
Goldträger	Bal-Tec, Witten/Ruhr
Glasstreifen	Labtec, Langenfeld
Kupfer-Grids 200 mesh	Polysciences, Eppelheim

Kupferträgernetzchen Typ G600HH	Plano GmbH, Wetzlar
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nagellack	Astor, Zug, Schweiz
Parafilm M	American Nat. Can, Greenwich, USA
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
PVDF WesternBlotting Membran	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Qiashredder	Qiagen, Hilden
Safe Seal Tips Premium 2.5 –1000 µl	Biozym, Hess Oldendorf
Tissue-Tek Kapseln	Tissue-Tek, Niederlande

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische und proteinchemische Methoden

3.2.1.1 RNA-Isolierung

3.2.1.1.1 Gewinnung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das Qiagen Rneasy Kit verwendet. Die gesamte RNA-Aufreinigung wurde nach den Empfehlungen des Herstellers bei Raumtemperatur durchgeführt. Alternativ wurden hierzu 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen mit 350 µl RLT-Puffer direkt in der Zellkulturschale oder nach Trypsinierung und Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) lysiert. Das gewonnene Zellysate wurde mit Qiashredder-Säulen durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) homogenisiert und das Eluat mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt. Anschließend wurde der komplette Ansatz in eine RNA Extraktionssäule pipettiert und nicht gebundene Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) entfernt. Nachdem die an das Säulenmaterial gebundene Gesamt-RNA 1x mit RW1 Waschpuffer (13000 rpm, 2 min) gereinigt wurde, wurden auf der Säule verbliebene Reste genomischer DNA durch Inkubation mit DNase I (30 min, RT) verdaut und in einem weiteren Waschschriff mit 300 µl RW1 Puffer entfernt. Danach wurde das Säulenmaterial 2x mit 300 µl bzw. 500 µl RPE Puffer gewaschen (13000 rpm, 2 min) und schließlich die gereinigte RNA in 30 µl RNase freiem H₂O eluiert.

3.2.1.1.2 Gewinnung von mRNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit dem MagNA Pure LC Pipettierautomat unter Verwendung des MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Roche). Hierzu wurden 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 300 μ l Lysepuffer des MagNA Pure mRNA Isolation Kit aufgenommen, die Zellysate in die vorgesehenen Probengefäße pipettiert und das Gerät mit den nötigen Reagenzien und Auffanggefäßen bestückt. Nach dem Start des Reinigungsprogramms wurde die mRNA vollautomatisch aus den Zellysaten isoliert. Das Prinzip der mRNA Fraktionierung beruht dabei auf der reversiblen Wechselwirkung von Biotin markierten Oligo (dT) Sonden mit den 3' Poly-A Enden von mRNA Molekülen sowie Bindung dieser Komplexe an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel. Mit Hilfe eines Magneten wird die an die Partikel gebundene mRNA in einer Pipettenspitze festgehalten und dabei von anderen zellulären Bestandteilen abgetrennt. Nach Waschen der gebundenen Partikel wird die mRNA durch Temperaturerhöhung eluiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Elutionspuffer aufbewahrt.

3.2.1.2 RNA-Quantifizierung

Die Bestimmung von RNA Konzentrationen erfolgte alternativ mit einem Spektralphotometer oder unter Verwendung des RiboGreen RNA Quantification Kit. Bei der photometrischen Messung wurde nach Abgleichen der Nullwerte das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration nach folgender Formel durchgeführt: $C[\text{mg/ml}] = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$ (C = Konzentration der gemessenen Probe; E = Extinktion; E_{260} = Absorptionsmaximum von RNA; E_{320} = Nullwert; f = Verdünnungsfaktor; c = Konzentration Standard/Extinktion Standard, für RNA $c = 0.04\text{ mg/ml}$). Gleichzeitig wurde die Absorption des Proteinanteils in der Probe gemessen (E_{280} ; Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm) und der Quotient E_{260}/E_{280} als Maß für die Reinheit der RNA bestimmt (Sollwert: 2.0 ± 0.2).

Die Quantifizierung von mRNA mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit basiert auf dem Prinzip der spezifischen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs RiboGreen an RNA. Zur Bestimmung einer Eichgerade wurde parallel zu den Proben ribosomale RNA in 6 verschiedenen Konzentrationen (2.5 bis 250 ng/ μ l) in eine 96-well Plate pipettiert und anschließend jeweils 75 nM RiboGreen zugefügt. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde am SPECTRAFluor Plus Fluoreszenzreader (Tecan) vermessen sowie die RNA Konzentrationen der Proben mit Hilfe der Gleichung für die Standard-Regressionsgerade bestimmt.

3.2.1.3 Semiquantitative RT-PCR

Die relative Expression von Claudin-1, -3, -4, Occludin, ZO-1 und GAPDH mRNA wurde mit genspezifischen Primern (siehe 2.1.5) durch reverse Transkriptase PCR und Verwendung des LightCycler Geräts (Roche) bestimmt. Für die RT-PCR Reaktionen wurden pro Ansatz gleiche Mengen Gesamt-RNA (100-500 ng) oder mRNA (10-50 ng) mit den Komponenten des RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche) in eine Glaskapillaren pipettiert. Für jede Reaktion wurden 0,4 µl Enzymmix (enthält reverse Transkriptase und DNA Polymerase), 4 µl Reaktionsmix (enthält NTPs und SYBR Green I), 9,2 µl RNase freies Wasser, 3 µl Resolution Solution (reduziert Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen), 2,4 µl MgCl₂ (6 µM), 2 µl Primermix (je 10 pM) und 2 µl RNA-Probe (enthält ca. 10-50 ng mRNA bzw. 100-500 ng Gesamt-RNA) eingesetzt. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 5 sec) wurden die Glaskapillaren in den Rotor des LightCycler Gerät eingesetzt und das Meßprogramm gestartet.

Das Programm bestand aus einem RT Schritt (Synthese genspezifischer cDNA; 10 min, 50 °C) und einem PCR Schritt (DNA-Amplifikation mit 40 PCR-Zyklen: 1. Denaturierung 95 °C, 2. Primer-Annealing 54 bzw. 58 °C, 3. Elongation 72 °C). Die optimierten Annealingtemperaturen betrugen 58 °C für Claudin-1,-3,-4 und GAPDH Detektion bzw. 54 °C für den Nachweis von Occludin und ZO-1. Die Menge des synthetisierten PCR-Produkts wurde nach jedem PCR-Zyklus durch Messung der Fluoreszenzintensität (Einbau von SYBR Green I in doppelsträngige DNA) bei einer Temperatur von 84 °C bestimmt und so der RT-PCR Verlauf aufgezeichnet (Real-time PCR). Der Abschluß des Programms bildete eine Schmelzpunktanalyse des Reaktionsprodukts durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung bei Temperaturerhöhung von 40 °C auf 99 °C.

Aus den aufgezeichneten PCR-Kurven wurde mit Hilfe eines Auswertungsprogramms der relative Unterschied der mRNA Expression in verschiedenen Proben ermittelt. Dabei wurde für jede PCR-Kurve ein Schwellenwert bestimmt, der den Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion festlegt. Die Zyklenzahl, bei der die PCR-Kurve in die exponentielle Phase übergeht (Crossing Point = cp) gibt Auskunft über den relativen Expressionsunterschied der initial in den Proben vorhandenen spezifischen mRNA Moleküle. Die Berechnung der Expressionsniveaus in % erfolgte nach folgender Formel: $\text{relative Expression} = 100/2^{\Delta\text{cp}} \%$

3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität von PCR-Produkten zu überprüfen, wurde die Größe amplifizierter DNA-Fragmente unter Verwendung eines DNA-Größenmarkers (DNA Leiter Roche XIV) auf 1%igen Agarosegelen bestimmt. Zur Herstellung der Gele wurden 100 ml 1x TAE-Puffer mit 1 g Agarose aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 55°C wurde diese in ein abgeklebtes Geltablett mit Gelkamm gegossen und nach Erstarren des Gels in einen mit Laufpuffer gefüllten Geltank eingelegt. Pro Geltasche wurden 23 µl Probe geladen (10 µl PCR-Produkt, 10 µl H₂O und 3 µl Ladepuffer) und die PCR Produkte in einer Elektrophoresekammer bei 100 mV für 30 min dargestellt.

3.2.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung

Um die Produktspezifität amplifizierter Sequenzen zweifelsfrei sicherzustellen, wurden die PCR-Produkte nach Anleitung des Qiaquick PCR Purification Kit Protocol aufgereinigt und von der Firma Medigenomix (Martinsried, München) sequenziert. Um dazu die PCR-Fragmente von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen zu befreien, wurden 15 µl PCR-Produkt mit 75 µl PB-Puffer versetzt, in ein Qiaquick Säulchen pipettiert und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min). Anschließend wurde die gebundene DNA 1x mit 75 µl PE-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation in 30 µl EB-Puffer eluiert (beide Puffer sind Komponenten des Qiaquick PCR Purification Kit). Für die Sequenzierung wurden jeweils die gleichen für die PCR eingesetzten Primer verwendet.

3.2.1.6 Gewinnung zellulärer Proteinextrakte

Für die Herstellung von Zellysaten zum Proteinnachweis wurde RIPA Puffer verwendet. 5×10^5 bis 5×10^6 Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 1x PBS von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgekratzt und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 100-300 µl RIPA Puffer aufgenommen, mehrmals resuspendiert und anschließend wurden nicht solubilisierbare Zellbestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde in Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigen N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.7 Proteinquantifizierung von Zellextrakten

Zur Quantifizierung von proteinhaltigen Zellextrakten wurde der BCA Protein Assay Kit von Pierce eingesetzt. Dieser Test basiert auf der kolorimetrischen Detektion von Proteinen in alkalischer Lösung durch Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} im Komplex mit Proteinen (Tetradenat- Cu^{1+} -Komplex) und der Bildung eines violettten Farbkomplexes von Cu^{1+} mit Bicinchoninsäure (BCA). Dazu wurden die Lysate 1:10 mit RIPA Puffer verdünnt und parallel zu den Proben BSA in einer Konzentrationsreihe von 0.1 mg/ml bis 1.5 mg/ml in eine 96-Well Platte eingesetzt. Reagenz A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt, jeweils 200 μl Mischung zu 100 μl Proteinlösung pipettiert und 15 min auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Der Farbumschlag wurde mit dem ELISA Plattenlesegerät Image Spectra Rainbow (Tecan) bei einer Wellenlänge von 542 nm detektiert.

3.2.1.8 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Western-Blot Analyse

Für die elektrophoretische Auftrennung von zellulärem Gesamtprotein wurde das SDS-PAGE System der Firma Novex verwendet. Dabei kamen 4-12 %ige NuPAGE Bis-Tris Gele mit zugehörigem MES SDS Laufpuffersystem zum Einsatz. Die Proteinextrakte wurden in einer 1:4 Verdünnung in NuPAGE LDS Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 72°C denaturiert. Anschließend wurden bis zu 50 μg Gesamtprotein pro Geltasche auf das Gel geladen und die Proteine bei einer konstanten Spannung von 200 V nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts analysierter Proteine wurden jeweils zusätzlich in eine Spur des Gels 10 μl eines Größenstandards geladen (Multi-Marker; Invitrogen).

Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Proteine mit Hilfe einer Semi Dry Blot Apparatur (Biorad) auf PVDF oder Nitrozellulose Membranen transferiert. Dazu wurden vier Lagen Whatman-Papier, das Gel und die Membran (PVDF Membranen wurden vorher kurz in 100 % Methanol benetzt) in Semi Dry Transfer Puffer inkubiert und anschließend der Western Blot Sandwich (2 Lagen Whatman-Papier, die Membran, das Gel und 2 Lagen Whatman-Papier) zwischen Kathode (gelseitig) und Anode (membranseitig) der Western Blot Apparatur geklemmt. Für den Proteintransfer wurde 1 h lang eine konstante Stromstärke von 60 mA angelegt. Anschließend erfolgte die Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe des Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Kit (Roche). Dazu wurde die Membran 1 h lang in Blockierlösung (5 g Blockierreagenz des genannten Kit in 100 ml TBST) geschwenkt und über Nacht bei 4 °C in mit Antikörper supplementierter Blockierlösung inkubiert (Endkonzentration primäre Antikörper 1-20 $\mu\text{g/ml}$). Die verwendeten primären Antikörper gegen Claudin-1, -2, -3, -4, Occludin und ZO-1 wurden

dementsprechend in einer 1:1000 Verdünnung sowie Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 und β -Actin in einer 1:400 bzw. 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Bevor die Membranen in Blockierlösung mit 1:1000 verdünnten HRP-konjugierten sekundären Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen IgGs inkubiert wurde, wurde diese für 4x 15 min in TBST geschüttelt und 15 min in Blockierlösung inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten mit TBST wurde die Membran 5 Sekunden in 10 ml Lumi-Light Substrat geschwenkt, anschließend in eine Klarsichtfolie gepackt und das bei der Substratumsetzung auf der Membran emittierte Licht mit einem Lumineszenz-Detektionsfilm in der Dunkelkammer nachgewiesen.

3.2.1.9 ELISA-Nachweis Histon H4 Acetylierung

Änderungen des Acetylierungsstatus von Histon H4 nach Behandlung mit HDAC Inhibitoren wurden in einem ELISA-Test gemessen. Dazu wurden 5000 Zellen/Well in eine 96-Well Platte ausgesät und nach Anheftung zwischen 6 und 48 h mit HDAC Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ l PBS/Well gewaschen und für 1 h mit je 200 μ l Ethanol (100 %) pro Well bei -20°C fixiert. Nach 2 Waschschritten mit je 200 μ l/Well Low Salt und High Salt Natriumphosphatpuffer (je pH 7.4 und 10 mM Natriumphosphat, High Salt: 150 mM bzw. Low Salt: 500 mM NaCl) wurden unspezifische Bindungsstellen mit 100 μ l/Well Blockierungs- und Permeabilisierungspuffer unter Schütteln (1x GSDB („Goat Serum Diluting Buffer“): Ziegen-serum, 5 % Triton X-100, 120 mM Natriumphosphatpuffer, 2 M NaCl, pH 7.4) für 30 min abge-sättigt. Dann wurden die Zellen mit primärem Kaninchen Anti-acetyliertes Histon H4 Antikörper (Verdünnung 1:200 in 1x GSDB; 50 μ l/Well) 1 h lang bei 37°C geschüttelt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 50 μ l/Well in Gegenwart von High Salt Natriumphosphat-puffer wurde mit POD konjugierter Ziege Anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:2000 in 1x GSDB) noch-mals 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde je 1x mit 200 μ l/Well High Salt und Low Salt Natrium-phosphatpuffer gewaschen und zum Nachweis der POD Aktivität 50 μ l/Well ABTS Substrat-lösung (1 mg/ml) zugegeben. Abschließend wurde die 96-Well Platte für 10 min bei 37°C inku-biert und Änderungen der Absorption 405 nm/690 nm im ELISA Reader Image Spectra Rainbow gemessen.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Brusttumorzelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in mit 10 % FKS und 2 mM L-Glutamin supplementieren RPMI 1640 Medium kultiviert. Von normalen Brustdrüsenepithel abgeleitete HMEC Zellen wurden in MEBM-Medium (Clonetics) gezüchtet, welches mit den Komponenten des MEGM BulletKit versetzt wurde. Dazu wurde pro 500 ml MEBM-Medium mit je 2 ml bovines Hypophysen-extrakt (13 mg/ml), 0.5 ml hEGF (10 µg/ml), 0.5 ml Insulin (5 mg/ml), 0.5 ml Hydrocortisone (0.5 mg/ml) und 0.5 ml Gentamicin/Amphotericin-B Mix (50 mg/ml bzw. 50 ng/ml) supplementiert.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit ca. 10⁴ Zellen pro cm² Zellkulturflasche ausgesät und 2x wöchentlich im Verhältnis 1:10 gesplittet, um eine konstante subkonfluente Kultur zu erhalten. Zur Passagierung und Ernte adhärenter Zellkulturen wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem die abgelösten Zellen in der Flasche mehrmals in Trypsin-EDTA Lösung resuspendiert wurden, wurde die Reaktion durch Zusatz von serumhaltigem Medium gestoppt. 1/10 Volumenanteil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche eingesät oder die Zellen wurden alternativ für weitere Analysen pelletiert (1500 rpm, 5 min), 1x PBS gewaschen und bis zu ihrer Verwendung im -80 °C Gefrierschrank gelagert.

Zur Herstellung von MDA-MB 361 Sphäroidkulturen wurden 5x 10⁴ Zellen in 24-Wellplatten ausgesät, die zur Unterbindung der Adhärenz mit Poly-HEMA beschichtet wurden (171). Für die Oberflächenbeschichtung wurde eine 0.5 %ige Poly-HEMA Lösung in Ethanol (95 %) hergestellt und 300 µl pro 1 cm² Wachstumsfläche in die Zellkulturgefäße eingebracht. Die Platten wurden mit geschlossenem Deckel anschließend 2 Tage bei 37 °C getrocknet und vor Benutzung mit Zellkulturmedium gewaschen. Bei der Kultivierung von MDA-MB 361 Zellen in Poly-HEMA beschichteten Platten wurde das Zellkulturmedium jeden zweiten Tag durch vorsichtiges Absaugen des Kulturüberstandes sowie Zugabe von frischem Medium erneuert.

3.2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1 beschrieben geerntet, jeweils 2x 10⁶ Zellen pro 1 ml Einfriermedium (10% FKS in Zellkulturmedium + 10 % DMSO, 4 °C) aufgenommen und in Portionen zu je 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden in einem Einfriercontainer über Nacht auf -80 °C abgekühlt und anschließend in einem Flüssigstickstofftank bei -196 °C aufbewahrt.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Generationszeit eukaryotischer Zellen

Die Bestimmung der Zellkonzentration einer Einzelzellsuspension erfolgte nach geeigneter Verdünnung in Casyton-Lösung unter Verwendung des Casy TTC Zellzählgeräts. Um das in vitro Wachstum einer Zelllinie zu bestimmen, wurde die Generationszeit G der Zellpopulation mit folgender Formel bestimmt: $G = t/n$ wobei t der Zeitraum zwischen zwei Messungen und n die Generationszahl ist; Die Generationszahl n berechnet sich dabei wie folgt: $n = \log N(t) - \log N_0 / \log 2$; $N(t)$ = Zellzahl zum Zeitpunkt t , N_0 = Zellzahl zu Beginn der Messung.

3.2.2.4 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) konfluenter Zellschichten

Für Permeabilitätsstudien wurden Brusttumorzellen in „Cell Culture Inserts“ auf porösen Polycarbonatfiltern mit einem Porendurchmesser von $0.4 \mu\text{m}$ und einer Wachstumsfläche von 1.1 cm^2 (12-Wellplatten) bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Durch die permeable Membran mit dem Zellmonolayer wird das Well in eine obere, apikale Kammer (1 ml) und eine untere, basolaterale Kammer (1.5 ml) getrennt. Die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER = Transepithelial Electrical Resistance) wurde mit einem Millicell-ERS Voltohmmeter mit sog. Chopstick-Elektroden nach der Bedienungsanleitung des Herstellers in serumhaltigen Medium durchgeführt. Vor der Messung wurden die Elektroden nach Desinfektion in 70 % Ethanol für 1 h in Messpuffer (Zellkulturmedium mit 10 % FKS) äquilibriert. Bei der Messung wurde darauf geachtet, daß die Elektroden mittig und senkrecht in die Transwell-Schalen eingeführt wurden, da die Positionierung der Elektroden Einfluß auf den Messwert hat. Der TER-Wert für den Monolayer eines Transwell-Inserts berechnet sich wie folgt: $\text{TER } (\Omega/\text{cm}^2) = (\text{Messwert} - \text{Leerwert}) / \text{Wachstumsfläche Membran}$, wobei der Leerwert den Widerstand der Membran ohne Zellen darstellt.

3.2.2.5 Bestimmung der parazellulären Molekülfluxrate

Um die Funktionalität von Tight Junctions zu untersuchen, wurde der parazelluläre Flux von Fluorescein sowie FITC-makierter Dextranmoleküle über konfluente Zellschichten gemessen. Dazu wurden die Zellen wie unter 3.2.2.4 beschrieben auf Membraneinsätzen bis zur absoluten Konfluenz in Zellkulturmedium kultiviert. Für den Assay wurde Fluorescein ($3 \mu\text{g/ml}$), 3 oder 40 kDa FITC-Dextran ($3\text{-}50 \mu\text{g/ml}$) in die obere Kammer des Wells pipettiert und in regelmäßigen Zeitabständen aus der unteren Kammer $100 \mu\text{l}$ Proben entnommen, welche in eine 96-Wellplatte pipettiert und im Dunkeln bei RT gelagert wurden. Zwischen den Probennahmen wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zeitkinetik der Zunahme der Fluoreszenz-

intensität wurde mit dem ELISA Plattenlesegerät Spectra Fluor Plus (Tecan) bei der Anregungsmaximum von FITC bei 485 nm detektiert und beim Maximum der Emissionsintensität von 535 nm gemessen.

3.2.3 Immunzytochemie adhärenter Tumorzellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden 5×10^4 Zellen in die Färbekammer eines mit Kollagen-I beschichteten Biocoat Tissue Slides (BD Falcon) ausgesät und für mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Erreichen einer konfluenten Zellkultur wurde das Medium entfernt, 1x mit eiskaltem RPMI-1640 Medium gewaschen und die Zellen anschließend für 30 min mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) auf Eis fixiert. Um temperaturabhängige Färbe-Artefakte zu vermeiden, wurden auch alle weiteren Schritte auf Eis und mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Nach Fixation der Zellen wurde 2x mit PBS gewaschen und für 30 min mit Permeations-/Blockierungspuffer inkubiert (PBS, 10 % FKS, 0,1 % Triton X-100). Nachfolgend wurden die permeabilisierten Zellen 1x mit Waschpuffer (PBS, 10 % FKS, 0,05 % Triton X-100) gewaschen und für 60 min mit Primärantikörper inkubiert (Endkonzentrationen: Maus Anti-Claudin-1: 10 µg/ml; Kaninchen Anti-Claudin-3: 1.25 µg/ml; Maus Anti-Claudin-4: 2.5 µg/ml; Maus Anti-Occludin: 1 µg/ml; Kaninchen Anti-Acetyliertes Histon H4: 2.5 µg/ml). Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurde Rhodamin-markiertes Phalloidin in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Ungebundene primäre Antikörpermoleküle wurden nachfolgend in zwei Waschschritten mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde für 60 min mit sekundärem Antikörper inkubiert (Endkonzentrationen: CY3 konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG: 2.5 µg/ml; CY3 konjugiertes Ziege Anti-Maus IgG: 4.5 µg/ml). Für eine Doppelfärbung mit Zonula Occludens-1 (ZO-1) wurde nach 2 Waschschritten mit Waschpuffer nochmals für 1 h mit FITC markiertem Maus Anti-ZO-1 Antikörper (5 µg/ml) inkubiert, bevor schließlich die Zellkerne mit DAPI (2 µg/ml) angefärbt wurden. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde das Präparat mit einem Glasplättchen in Mounting Medium eingedeckelt, wobei man das Deckgläschen an den Rändern mit Nagellack fixierte. Die Proben wurden bei -20 °C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.2.4 Tierversuche

3.2.4.1 Haltung und Fütterung der Mäuse

Die verwendeten weiblichen SCID-Mäuse (C.B.-17/lcr scid/scid) wurden im Alter von 6-8 Wochen vom Züchter (Ry Bomholtgard, Dänemark) ca. 3 Wochen vor Versuchsbeginn in speziellen Transportkäfigen angeliefert. Um den Gesundheitsstatus der Mäuse zu beobachten, wurden die Tiere bis ca. 1 Woche nach Ankunft in einer speziellen Quarantäneeinheit des Versuchstierstalls gehalten, bevor sie weitere 16 Tage vor Beginn des Versuchs zur Adaptation im eigentlichen Tierstall verbrachten. Gemäß der FELASA-Richtlinien waren alle Tiere frei von mäusepathogenen Mikroorganismen und konnten somit unter SPF-Bedingungen in Gruppen zu je 5 Mäusen pro Käfig (Makrolon Typ III) gehalten werden. Als Futter wurde pelletiertes und bestrahltes Nagerralleinfutter (Altromin diet 1434, Lage) und Wasser ad libitum angeboten. In den Versuchsterräumen herrschten standardisierte Umweltbedingungen von 22 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit, wobei ein automatisiertes Programm für einen regelmäßigen Tag/Nacht Rhythmus von je 12 h Hell und Dunkel sorgte. Da es sich bei den durchgeführten Versuchen um anzeigepflichtige Tierversuche gemäß § 8 Abs.7 Nr.1 und 2 des deutschen Tierschutzgesetzes handelte, mußte vor Durchführung eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern erteilt werden. Die Versuche wurden unter dem Aktenzeichen AZ211-2531.2-32/98 „humanes subkutanes Tumormodell“ geführt.

3.2.4.2 Subkutane Injektion von Tumorzellen

Am Tag des Versuchsbeginns wurde den Tieren die Tumorzellen durch subkutane Injektion appliziert. Für diesen Eingriff wurden die Mäuse in einer speziell angefertigten Plexiglaskammer mit Narkosegas (4 % Isofluran/Trärgas Sauerstoff) behandelt und nach Eintritt des Toleranzstadiums entnommen und in linker Seitenlage auf den Operationstisch gelegt. Während der Operation blieben die Mäuse über eine Silikonmaske weiterhin mit Narkosegas versorgt (1-3 % Isofluran). Nachdem die rechte Seite der Tiere rasiert und mit jodhaltigem Desinfektionsmittel (Braunol[®]) desinfiziert worden war, wurden 3×10^6 Zellen in 200 µl PBS mit einer 1 ml Spritze und einer 26 G Nadel (0,45 x 23 mm) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach der Operation wurden die Mäuse in den Käfig zurückgelegt, während der kurzen Aufwachphase beobachtet und zum Ausgleich von Wärmeverlusten aus geeigneter Entfernung mit Rotlicht bestrahlt.

3.2.4.3 Messung von Tumorgröße und Körpergewicht

Bei den durchgeführten Versuchen wurde sowohl die Tumorgröße als auch das Körpergewicht der Mäuse 1x pro Woche bestimmt. Die Größe der unter der Haut gewachsenden Tumore wurde mittels eines elektronischen Messschiebers protokolliert. Das Volumen des Tumors wurde nach folgender Formel berechnet: Tumolvolumen (mm^3) = Tumorlänge (mm) x Tumorbreite (mm) x Tumorbreite (mm)/2.

3.2.4.4 Abbruchkriterien und Versuchsende

Aufgrund der Richtlinien des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und des Arbeitskreises 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) “Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch” wurden folgende Abbruchkriterien festgelegt: a) exzessives Tumorwachstum (Tumordurchmesser ≥ 20 mm bzw. Tumorgewicht > 4 g) und b) durch das Tumorwachstum bedingte Reduktion des Körpergewichts > 20 %. Nach Feststellung eines Abbruchkriteriums und am letzten Versuchstag wurden die Tiere durch transzervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Xenograftumorgewebe aus den Mäusen präpariert und mit einem Skalpell in mehrere Teile geschnitten. Für nachfolgende Analysen wurden die Tumorstücke sofort in 3.7%iger Formaldehydlösung oder in Zinkfixans konserviert (Histologie und Immunhistochemie, siehe 3.2.5) oder zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen zerkleinert in 1%iger Formaldehydlösung fixiert (Durchflußzytometrie, siehe 3.2.6).

3.2.5 Histologische und immunhistochemische Analyse

3.2.5.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte

Für nachfolgende histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde das Xenograftumorgewebe nach der Entnahme für mindestens 24 h in gepufferter 3.7%iger Formaldehydlösung oder Zinklösung (siehe 3.1.3) fixiert, mit einem Skalpell in 2-3 mm dicke Stücke geschnitten und in einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) bei Raumtemperatur dehydriert. Im letzten Programmschritt wurde das Gewebe von Xylol in Paraffin überführt. Das Programm beinhaltet dabei folgende Dehydrierungsschritte: H_2O (Immersionszeit: 2 h), 3x 70 % Ethanol (je 1.5 h), 2x 95 % Ethanol (je 1.5 h), 2x 100 % Ethanol (je 1.5 h), 3x Xylol (je 1.5 h), 2x Paraffin (2 h, 60 °C). Im Anschluss daran wurde das Tumorgewebe an einer Ausbettstation (Tissue-Tek, Niederlande), die aus einem heißen Paraffinbad, einer Kühlplatte, vorgeheizten Pinzetten und Metallförmchen besteht, in Paraffinblöcke eingebettet. Von dem in Paraffin

eingebetteten Gewebe wurden mit einem Schlittenmikrotom 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Plus-Objektträger aufgezogen, welche über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt wurden.

3.2.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-1

Für immunhistochemische Färbungen war es notwendig, die in Paraffin konservierten Gewebeschnitte von Paraffin zu befreien und zu rehydrieren. Dazu wurden in Formaldehydlösung fixierte Schnitte 2x 5 min in Xylol deparaffiniert und anschließend 2x in 100 % Ethanol (3 min), je 1x in 90 %, 80 %, 70 % Ethanol (je 3 min), H₂O dest (1 min) und PBS (5 min) rehydriert. Für die nachfolgende Demaskierung der Epitope wurde ein mit Unmasking Solution pH 10,1 (Biogenex) befüllter MultiGourmet Dampfkochtopf (Braun) auf 97 °C aufgeheizt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer ebenfalls mit alkalischer Unmasking Solution befüllten, offenen Färbekammer in den Dampfkochtopf gegeben und solange inkubiert bis die Temperatur in der Färbekammer 97 °C betrug. Nach 20 min Inkubation bei 97 °C wurden die Gewebeschnitte aus dem Dampfkochtopf genommen und bis zum Erreichen einer Temperatur von 60 °C in Unmasking Solution belassen (ca. 10 min). Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren wurden die Objektträger nun für 5 min in 3 %iger H₂O₂ Lösung inkubiert und nachfolgend 2x mit TBST gewaschen.

Für die Antikörperfärbung wurde das Gewebe auf den Objektträgern mit einem speziellen Stift (DAKO Pen) eingekreist, um bei den folgenden Schritten ein Abfließen der aufgetragenen Lösungen (ca. 150 µl) zu vermeiden. Initial wurde für 30 min mit Blockierungsserum (1x Blockierungslösung DIG Wash and Block in PBS mit 10 % Pferdeserum) inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Dabei stammte das eingesetzte Serum von der Spezies, in der der sekundäre Antikörper hergestellt wurde. Nachdem das Blockierungsserum vom Objektträger abgekippt worden war, wurde der primäre Maus Anti-Human Claudin-1 Antikörper in Blockierungsserum vorsichtig auf das Gewebe pipettiert (Endkonzentration 20 µg/ml) und der Objektträger in einer geschlossenen Feuchtkammer über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach zwei Waschschritten von jeweils 3 min mit TBST wurde das Gewebe am nächsten Tag für 45 min mit einem biotinylierten Pferde Anti-Maus Sekundärantikörper (1:100 in Blockierungsserum) inkubiert. Danach wurden zwei weitere Waschschrritte mit TBST durchgeführt und die Gewebeschnitte für 30 min mit einem Avidin-Biotin Komplex (je 2 Tropfen Reagenz A und B in 5 ml PBS) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 3x mit TBST gewaschen und die Farbreaktion durch Inkubation mit DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) entwickelt. Die Reaktion wurde nach Erreichen der optimalen Farbtintensität (ca. 30

Sekunden) mit Leitungswasser abgestoppt. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun nach Mayer für 10 Sekunden gegengefärbt und für die dauerhafte Lagerung in 70 %, 85 %, 95 % und 100 % Ethanol je 1 min dehydriert und in Xylol (2x 5 min) überführt. Schließlich wurden die Objekträger mit einem Eindeckautomaten (Tissue-Tek, Niederlande) eingedeckelt.

3.2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD34-positiven Gefäßen

Die Gefäßversorgung des untersuchten Tumorgewebes wurde durch immunhistochemische Färbung von CD34 Molekülen, welche zelltypspezifisch auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden, unter Verwendung eines Bildverarbeitungsprogramms morphometrisch bestimmt. Dazu wurden in Zinklösung fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wie in 3.2.5.2 beschrieben entparaffiniert und anschließend in einem Färbeautomat (Autostainer, DAKO) gefärbt. Um endogene Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte zu Anfang mit einer 3 %igen H_2O_2 - Lösung bedeckt (5 min, RT). Es folgte ein Waschschriff mit TBST. Anschließend inkubierte man mit Blockierungsserum (Kaninchenserum 1:50 in PBS/ 1 % BSA) für 20 min bei RT, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Lösung wurde ohne Waschschriff vom Schnitt entfernt. Als nächstes folgte eine Inkubation mit Primär-AK (Ratte Anti-Maus CD34, Hycult Biotechnology) für 1 h bei RT, wobei der Antikörper in einer 1:50 Verdünnung in "Antibody Diluent" (DAKO) eingesetzt wurde. Der eingesetzte Antikörper erkennt ein Neuraminidase-sensitives Epitop, welches vorrangig auf Endothel kleiner Blutgefäße, neuformierender Kapillaren oder sich entwickelnder Gefäßstrukturen vorkommt (170). Nach einem weiteren Waschschriff mit TBST wurde ein biotinylierter Sekundär-AK (Kaninchen Anti-Ratte IgG, Vektor) für 30 min bei RT aufgebracht. Die Verdünnung erfolgte jetzt im Verhältnis 1:100 in mäuse-serumhaltigen Blockierungsserum (Mäuseserum 1:20 in PBS/0.1 % BSA). Als Tertiärreagenz wurde HRP konjugiertes Streptavidin (aus ChemMate-Kit CM 5001; Streptavidin-Biotin HRP/DAB Kaninchen/Maus, DAKO) verwendet. Nachdem die Proben 10 min bei RT inkubiert wurden, folgte ein Waschschriff mit TBST. Anschließend erfolgte die Farbreaktion mit DAB (DAKO) über 5 min bei RT. Die Farbreaktion mit Hämalaun nach Mayer wurde manuell durchgeführt, bevor als letzter Schriff die Schnitte eingedeckt wurden. Um die Gefäßversorgung verschiedener Xenografttumore miteinander vergleichen zu können, wurden die gefärbten Paraffinschnitte mikroskopisch analysiert und von jedem Gewebeschnitt 6 zufällige Abschnitte bei 100facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm MetaMorph 4.5.0.0. (Universal Imaging Corp., USA) morphometrisch ausgewertet. Dabei wurde die Gesamtanzahl der im Bildausschnitt gelegenen Pixel sowie deren Intensität bestimmt. Pixel mit einer über einem definierten

Schwellenwert gelegenen Intensität (mittlere Pixelintensität der Hintergrundfärbung) wurden durch Objektklassifizierung zu einzelnen Bildobjekten zusammengefasst und daraus die Anzahl der Gefäße pro Bildausschnitt (Gefäßdichte) bestimmt.

3.2.5.4 HE-Färbung

Die Bestimmung der Zahl mitotischer Zellen wurde an HE- (Hämatoxylin-Eosin) gefärbten histologischen Schnitten des Xenograftgewebes (siehe 3.2.5.1) durchgeführt. Bei der HE-Färbung werden die Zellkerne durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin blauschwarz bis violett und Cytoplasmabereiche mit dem sauren Xanthenfarbstoff Eosin rosa bis rot angefärbt. Dazu wurden entparaffinierte und rehydrierte Gewebeschnitte (siehe 3.2.5.2) in spezielle Farbstände einsortiert und in einer mit Hämalaun nach Mayer-Lösung (pH 3) gefüllten Glasküvette für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser „gebläut“, wobei Hämatoxylin durch Erhöhung des pH-Wertes seine charakteristische blaue Farbe ausbildet. Bevor und nachdem die Schnitte für die Zellplasmafärbung in 1 %iger Eosin-Lösung (ca. 1 min) eingelegt wurden, wurde nicht gebundener Farbstoff kurz in Aqua dest. ausgewaschen. Schließlich wurden die Gewebeschnitte in einer Alkoholreihe steigender Ethanolkonzentration dehydriert (70 % EtOH, 5 sec zur Differenzierung; 80 % und 90 % EtOH für je 30 sec, 2x 100 % EtOH für je 1 min und 2x Xylol für je 5 min), die Objektträger mit Eindeckmedium beschichtet und zum Schluß mit Deckgläsern eingedeckt.

3.2.6 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Analysen wurden mit dem FACScan und dem BD LSR von Becton Dickinson durchgeführt, wobei zur Anregung von Fluorochromen von Argon-Ionen und UV-Lasern emittiertes Laserlicht der Wellenlängen 488 und 325 nm verwendet wurde.

3.2.6.1 Analyse der Zellvitalität

Für die Bestimmung der Toxizität verwendeter Substanzen wurde eine Lebend-Tot Färbung mit Propidium Iodid (PI) durchgeführt, welches als geladenes Molekül nur in tote Zellen mit einer permeablen Plasmamembran penetriert und dabei an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet. Dazu wurde der Mediumüberstand der adhärenen Zellkultur (tote Zellen im Überstand) aus einer 24-Well Platte in ein FACS Röhrchen überführt, die Zellen mit 300 µl Trypsin-EDTA Lösung abgelöst und ebenfalls in das FACS Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert (1500 rpm, 5 min), 1x in warmen PBS gewaschen (37 °C) und zur Le-

bend-Tot Differenzierung vor der Messung für 5 min in PI-haltigem Zellkulturmedium (1 µg/ml) inkubiert.

3.2.6.2 Messung der Zellzyklusverteilung

Um die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation zu untersuchen, wurden Zellen wie unter 3.2.6.1 beschrieben trypsinisiert, pelletiert und 30 min mit PI-haltigem DNA Färbepuffer (siehe 3.1.3) bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Propidium-Iodid Fluoreszenz wurde am FACScan Gerät gemessen, wobei artifizielle Zellklumpen in einem *peak versus area plot* von der Messung ausgeschlossen wurden.

3.2.6.3 Claudin-1 Expressionsanalyse

Für den Nachweis von Claudin-1 in subkonfluenten und konfluenten T47-D Zellen wurden je 3×10^4 bzw. 3×10^5 Zellen in eine 6-Well Platte ausgesät und nach 24 h durch Passagierung mit eiskaltem Trypsin geerntet. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) wurde das Zellpellet in eiskaltem RPMI 1640 Medium gewaschen und die Zellen für 30 min mit 10 % Trichloressigsäure fixiert. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden primärer bzw. sekundärer Antikörper in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Maus Anti-Human Claudin-1 30 µg/ml bzw. Alexa 488 konjugierter Ziege Anti-Maus IgG 10 µg/ml). Die Claudin-1 Expression in T47-D Zellen wurde schließlich in Waschpuffer ohne Triton X-100 (PBS, 10 % FKS) mit dem FACScan Durchflußzytometer gemessen.

3.2.6.4 Messung der Apoptoserate in 2D und 3D Zellkulturen

Für die in vitro Untersuchung Claudin-1 abhängiger Apoptose in Tumorzellen wurde eine Annexin-V-Fluos Markierung durchgeführt. Annexin-V bindet in apoptotischen Zellen an der Zelloberfläche exponierte Phosphatidylserinreste die sich in vitalen, nicht-apoptotischen Zellen ausschließlich der intrazellulär zugewandten Seite der Zytoplasmamembran befinden. Hierzu wurden die Zellen in der adhärennten 2D oder 3D Sphäroidkultur wie unter 3.2.6.1 beschrieben trypsinisiert, pelletiert und 2x in PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. 1×10^5 Zellen für 15 min in 2 ml Medium mit Annexin-V Fluos (1 µg/ml) inkubiert und die Apoptoserate innerhalb von 15 min nach Zugabe von Propidium Iodid (1 µg/ml) am FACScan gemessen.

3.2.6.5 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Xenograft-Tumoren

Für die durchflußzytometrische Untersuchung von Tumorgewebe mußten Einzelzellsuspensionen hergestellt werden. Dazu wurden die Tumorproben in mit RPMI-1640 Medium befüllten Petrischalen mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten, in Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1500 rpm, 6 min). Das Pellet wurde in 1-2 ml (je nach Tumorgroße) Verdaupuffer (1x PBS, Hyaluronidase 250 µg/ml, Collagenase D 1,5 mg/ml) aufgenommen und die extrazelluläre Matrix für 1 h bei 37 °C auf dem Magnetrührer verdaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in spitzkonische FACS-Röhrchen überführt, abermals zentrifugiert und das Zellpellet in eiskaltem Fixierungspuffer (1 % Paraformaldehyd in PBS) aufgenommen. Nach einer Fixationszeit von 1 h bei 4 °C wurden 2 ml PBS zugegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Probe bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.6.6 Nachweis apoptotischer Zellen in Xenograft-Tumoren (TUNEL)

Durch die Aktivität von Endonukleasen wird in apoptotischen Zellen eine Degradation genomischer DNA hervorgerufen, die zu einem vermehrten Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen führt. In der TUNEL-Reaktion katalysiert die terminale Desoxyribo-nukleotid-Transferase (TdT) eine Template-unabhängige Polymerisation von FITC-markierten Nukleotiden an das 3'-Ende von DNA-Fragmenten. Die anschließende Färbung von DNA mit Hoechst 33258, welches sich vorwiegend an A-T reiche Regionen anlagert, macht eine parallele Zellzyklusanalyse und damit die Unterscheidung zwischen normal diploiden (Maus-Stroma) und polyploiden Zellen (Tumorgewebe) aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts möglich. Die TUNEL-Reaktion wurde gemäß dem Protokoll des „In Situ Cell Death Detection Kit“ (Roche) Beipackzettels durchgeführt. Dazu wurden fixierte Zellen einer Einzelzellsuspension (siehe 3.2.6.5) für 15 min in 1 ml Permeabilisierungspuffer (0.1 % Na-Citrat/0.1 % Triton X-100) aufgenommen. Im Anschluß daran wurde den Zellen 2 ml PBS zupipettiert und die Zellsuspension bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Für die Enzym-Reaktion wurde das Zellpellet in 50 µl TUNEL Reaktionsmix (Enzyme Solution 1:10 in Label Solution) resuspendiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Reaktionsmix ohne Enzym und als Positivkontrolle wurde eine Probe verwendet, die man zuvor für 5 min mit 10 µg/ml DNase inkubierte, um artifizielle Einzelstrangbrüche in die genomische DNA einzufügen. Durch Zugabe von 2 ml PBS wurde die Reaktion abgestoppt und nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl DNA Färbepuffer (5 µg/ml Hoechst 33258) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C wurden die Proben schließlich am BD LSR gemessen.

3.2.7 Transmissionslektronenmikroskopie (TEM)

3.2.7.1 Fixierung, Kontrastierung und Entwässerung der Proben

Für die TEM-Untersuchungen wurden MDA-MB 361 Brusttumorzellen in einer Petrischale gezüchtet. Nach Erreichen einer konfluenten Zellkultur wurde das Medium abgesaugt und 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 3x 20 min in Fixierlösung inkubiert (4 % Paraformaldehyd, 0.05 % Glutaraldehyd, 2 % Sucrose in PBS, pH 7,4) und 30 min in 2 %iger Glutaraldehyd-Lösung (in PBS, pH 7.4) nachfixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte die Kontrastierung der Zellen ("Osmierung") unter dem Abzug in 2 Schritten: a) Inkubation für 10 min mit 3 ml einer 2 %igen OsO_4 -Lösung und b) Zugabe des gleichen Volumenanteils einer 6 %igen $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung für 50 min. Anschließend wurden die Zellen 3x mit Aqua dest. gewaschen und dann mit steigenden Konzentrationen eines Ethanol/ H_2O -Gemisches (85 %, 95 %, 100 % Ethanol, je 3x 5 min) entwässert.

3.2.7.2 Einbettung

Nach der Entwässerung wurden die Zellen in der Petrischale schrittweise in niederviskosem Epoxydharz überführt. Die einzelnen Schritte (je 15 min) sind nachfolgend aufgeführt: 2x 90 % HPMA + 10 % abs. Ethanol, 2x HPMA pur, 1x HPMA : EPON 2:1, 1x HPMA : EPON 1:1, 1x HPMA : EPON 1:2, 3x EPON pur. Beim letzten Inkubationsschritt mit EPON wurden die Zellen mit einer ca. 3 mm dicken Schicht bedeckt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank belassen. Am nächsten Tag wurde die Temperatur im Brutschrank auf 60 °C erhöht und das Kunstharz für weitere 24 h ausgehärtet (Polymerisation). Für die Herstellung von 100 ml EPON-Kunstharz wurden 52.2 ml Epon, 24.6 ml DDSA und 32.6 ml MNA gut miteinander vermischt und anschließend 1.5 ml Beschleuniger DMP30 eingerührt.

3.2.7.3 Trimmen, Schneiden und Mikroskopie der Proben

Um den zu schneidenden Probenbereich im Lichtmikroskop auswählen zu können, wurden zunächst Semidünnschnitte (Schnittdicke 1-2 μm) mit einem Pyramitom hergestellt. Das Trimmen der Proben auf eine Anschnittfläche von 0.5-1 mm Kantenlänge erfolgte dann mit Hilfe des Pyramitoms bzw. einer Trimmfräse. Die für die Semidünnschnitte benötigten Glasmesser wurden mit Hilfe eines sog. „Knifemakers“ aus Glasstreifen gebrochen, während man ein Diamantmesser für die Herstellung von ca. 50 nm dicken Ultradünnschnitten verwendete. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetzchen aufgebracht, welche für eine bessere Haftung des Präparats mit Formvarfilm (Polyvinylformvar) beschichtet wurden. Nach Gegenfärbung mit einer Beizitrat-

lösung nach Reynolds (siehe 2.1.3) und Trocknung wurden die Ultradünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop LEO906E analysiert.

3.2.7.4 Gefrierbruchätzung

Für die Gefrierbruch-Analysen wurden konfluente MDA-MB 361 Zellen nach Entfernen des Kulturmediums 1x mit eiskalter Krebs-Ringerlösung (130 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 2.7 mM CaCl_2 , 11 mM Glucose, 20 mM HEPES pH 7.3) gewaschen, aus der Zellkulturschale gekratzt und ohne chemische Fixierung durch Zentrifugation geerntet (1500 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in ca. 10 μl der Überstandlösung resuspendiert und jeweils 1 μl Zellsuspension in einen Goldträger überführt. Unmittelbar darauf wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryofixiert. Die gefrorenen Proben wurden in eine Cressington CFE50 Gefrierätzanlage eingeschleust (Druck $p < 1.3 \times 10^{-5}$ Pa bzw. 10^{-7} mbar). Bei einer Proben temperatur von $T = -97$ °C wurden die Proben mit einem in flüssigem Stickstoff gekühlten Messer ($T < -185$ °C) gebrochen (Gefrierbruch). Anschließend wurde das gefrorene Oberflächenwasser der Bruchfläche für 4 min absublimiert (Gefrierätzung). Durch Bedampfen der Oberfläche mit Platin/Kohle (Winkel: 45°, Dicke: 1 nm) und Kohle (Winkel: 90°, Dicke: ca. 10 nm) wurden Abdrücke der Oberfläche (Replika) erhalten. Diese wurden auf 70 %iger Schwefelsäure abflotiert und über Nacht von den Resten der Zellen gereinigt. Nach zwei-maligem Waschen mit H_2O bidest. wurden die Replikas auf beglimmte (hydrophilisierte) Kupferträgernetzchen aufgenommen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden bei 120 keV an einem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt, welches mit einer LaB_6 -Kathode ausgestattet ist. Die Aufnahmen wurden mit einer slow-scan-CCD-Kamera digital aufgezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Expression und Funktion von Tight Junctions in Brusttumorzellen

4.1.1 Molekulare Expressionsanalyse von Claudin-1 in Brusttumorzelllinien

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren Analysen von Swisshelm et al., in denen eine stark reduzierte bzw. verlorengegangene Expression von Claudin-1 mRNA in 5 von 6 humanen Brusttumorzelllinien im Vergleich zu einer starken Expression in von normalem Brustepithelgewebe abgeleiteten „human mammary epithelial cells“ (HMECs) nachgewiesen wurde (159). Um die Claudin-1 mRNA- und Proteinexpression in konfluenten Zellkulturen genauer zu charakterisieren, wurden Zellysate aus acht Brusttumorzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades (172) sowie HMECs gewonnen und mittels semiquantitativer RT-PCR und Western-Blotting analysiert.

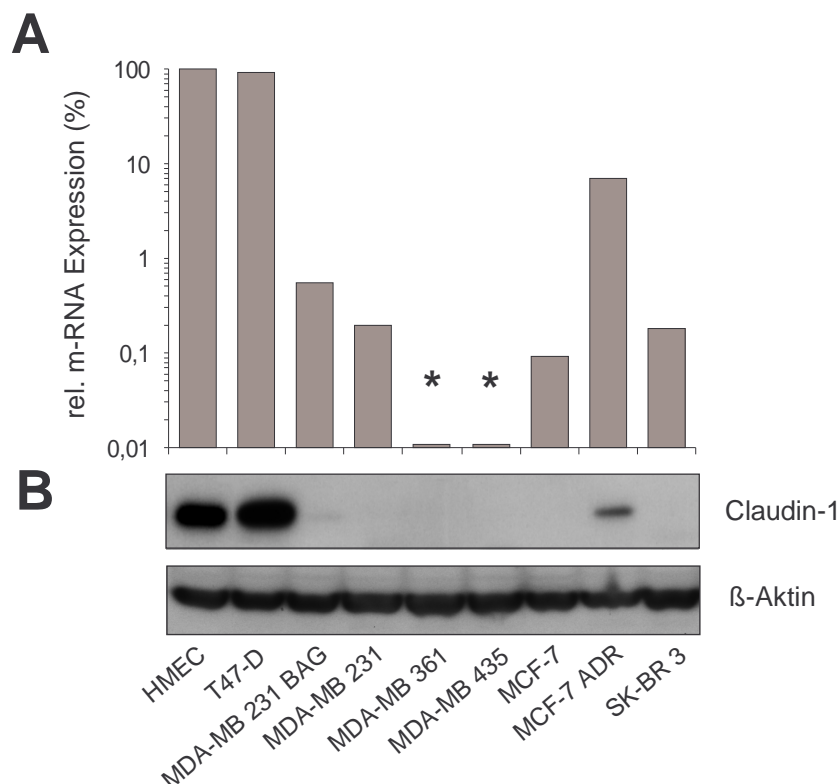


Abb. 1: Expression von Claudin-1 in HMECs und acht verschiedenen Brusttumorzelllinien; A) Die relative Claudin-1 mRNA Expression wurde aus den crossing points der RT-PCR Kurven berechnet und auf das Expressionsniveau von HMECs (100%) bezogen. In MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen konnte keine Claudin-1 mRNA detektiert werden (*); B) Western-Blot Analyse der Expression von Claudin-1 Protein. Als interne Ladekontrolle wurde die Expression von Beta-Aktin detektiert.

Wie in Abb.1 gezeigt, konnte für die hochdifferenzierte T47-D Zelllinie eine den HMECs (entspricht 100 % mRNA Expression) vergleichbar hohe Expression von Claudin-1 mRNA (relativ zu HMECs 92 %) und Protein ermittelt werden. Alle weiteren 7 untersuchten Brusttumorzelllinien zeichneten sich durch eine deutlich geringere Expression oder den Verlust der Expression von Claudin mRNA aus, wobei die jeweils geringe Menge an detektierter Claudin-1 mRNA mit einer geringen Quantität von Claudin-1 Protein korrelierte bzw. die Claudin-1 Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze des Western-Blotting Verfahrens lag. Bezogen auf die Claudin-1 mRNA Expression in HMECs betrugen die Expressionsniveaus in MCF-7 ADR 6.9 %, in MDA-MB 231 BAG 0.55 %, in SK-BR 3 0.2 % und 0.18 % in MCF-7 Zellen. In MDA-MB 435 und MDA-MB 361 Zellen konnten weder Claudin-1 mRNA noch Protein nachgewiesen werden.

4.1.2 Zelluläre Expression und Lokalisation von Claudin-1

Da T47-D Brusttumorzellen eine mit normalen HMEC Brustepithelzellen vergleichbare, hohe endogene Expression von Claudin-1 aufwiesen, wurde dieses Zellmodell für die Analyse der subzellulären Lokalisation von Claudin-1 herangezogen. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Claudin-1 Expression in T47-D Zellen zeigte sich eine starke Konzentrierung von Claudin-1 Protein entlang der Zytoplasmamembran an Zell-Zell-Kontaktstellen mit einer geringen vesikulär zytoplasmatischen Expression, wobei es sich dabei sehr wahrscheinlich um den gerichteten Membrantransport von Golgi-Apparat zu den Zell-Zell-Kontakten handelt (siehe Abb.2). Zellen, die keine oder wenige Kontakte zu Nachbarzellen ausgebildet hatten, zeigten zudem eine weniger intensive intrazelluläre Claudin-1 Färbung (siehe Pfeile). Um die Expression von Claudin-1 in Abhängigkeit der Anzahl von Zell-Zellkontakten quantitativ zu untersuchen, wurden T47-D Zellen wie unter 2.2.6.3 beschrieben mit geringer und hoher Zelldichte (3×10^4 bzw. 3×10^5 Zellen) in eine 6-Wellplatte ausgesät. In der subkonfluenten Zellkultur waren 24 h nach Einsaat immer noch ca. 30-50 % der Zellen vereinzelt, während die konfluente Zellkultur einen nahezu geschlossenen Zell-Monolayer ausbildete. T47-D Zellen beider Konfluenzzustände wurden hinsichtlich ihrer Claudin-1 Expression analysiert (siehe Abb.2 C-E).

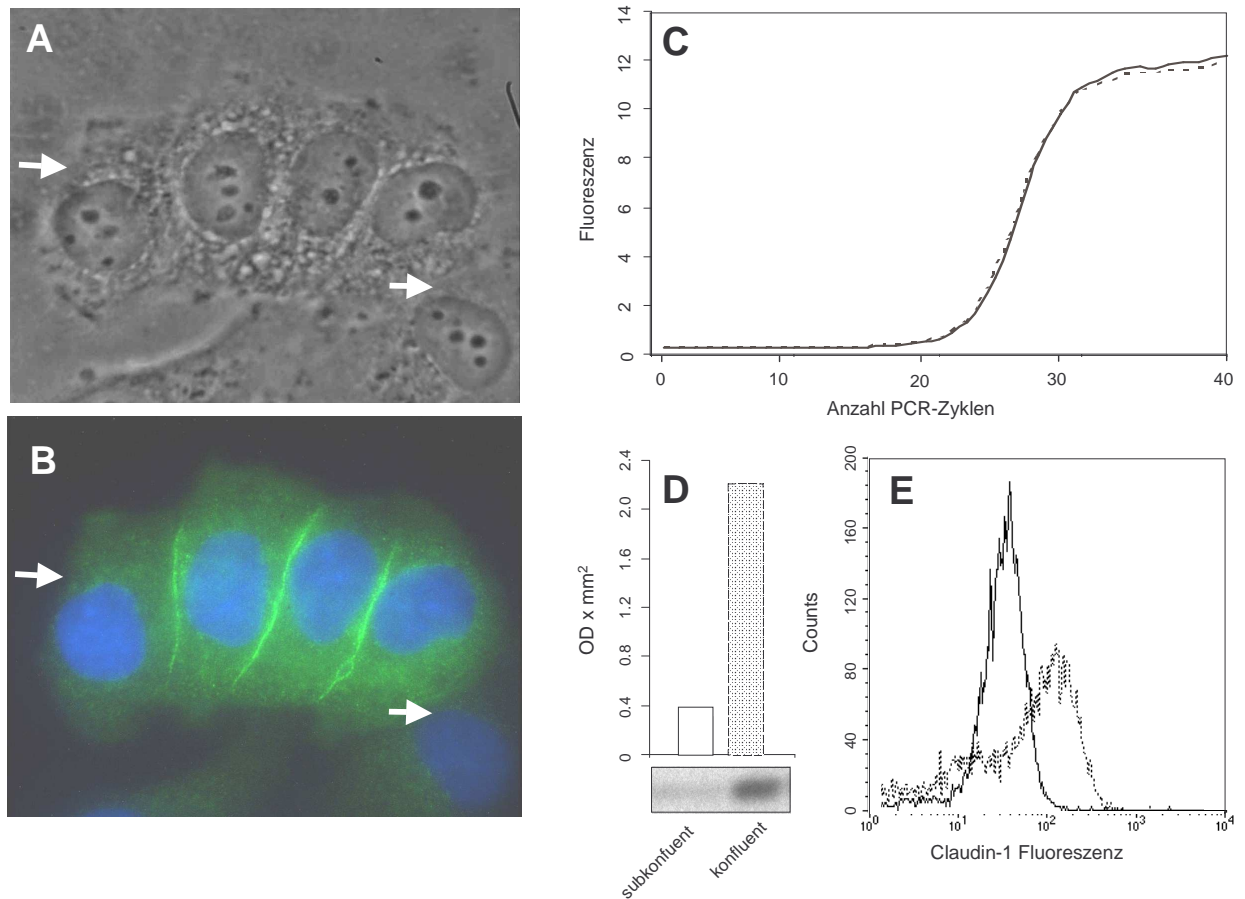


Abb.2: Claudin-1 Expression in T47-D Zellen. A, B: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Claudin-1 Lokalisation in T47-D Zellen; A) Phasenkontrast; B) Nachweis der Claudin-1 Expression und Lokalisation mit einem Maus Anti-Human Claudin-1 IgG Primär-AK und einem Alexa 488 konjugiertem Ziege Anti-Maus IgG Sekundär-AK, Zellkernfärbung: DAPI; Vergrößerung 630x; C-E: Expression von Claudin-1 in Abhängigkeit von der Zelldichte; Dazu wurde die Claudin-1 Expression in subkonfluenten (durchgezogene Linien/Balken) und konfluenten T47-D Zellkulturen (unterbrochene Linien/Balken) miteinander verglichen; C) RT-PCR Kurven der Claudin-1 mRNA Expression; D) Quantitative Western-Blot Analyse und E) Durchflußzytometrische Analyse der Claudin-1 Proteinexpression.

Aus den RT-PCR Kurven in Abb.2 C ist ersichtlich, daß T47-D Zellen unabhängig von der Zelldichte nahezu identische Mengen von Claudin-1 mRNA synthetisierten. Durch quantitative Western-Blot Analyse konnte jedoch gezeigt werden, daß die Claudin-1 Proteinmenge in der konfluenten Zellkultur im Vergleich zur subkonfluenten Zellkultur signifikant um den Faktor 7.2 erhöht war (siehe Abb.2 D). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde mit Hilfe der durchflußzytometrischen Einzelzellanalytik ebenfalls eine höhere Claudin-1 Proteinexpression in konfluenten T47-D Zellen gemessen (siehe Abb.2 E). Dabei betrug die mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle in der konfluenten Zellkultur 88.1 im Vergleich zu 34.2 in der subkonfluenten Zellkultur.

4.1.3 Funktionelle Analyse der Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzelllinien

Die funktionelle Charakterisierung von Claudin-1 in nicht-humanen und nicht-tumorigenen in vitro Zellmodellen hatte ergeben, daß Claudin-1 eine wesentliche funktionelle Komponente des Tight Junction Komplexes in Epithelien darstellt und die parazelluläre Ionen- und Molekülpassage blockiert (69, 94). Um zu verstehen inwieweit der Verlust der endogenen Claudin-1 Expression mit einem Funktionsverlust von Tight Junctions als parazelluläre Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen einhergeht, wurde eine Untersuchung der Tight Junction Funktion durchgeführt (Abb.3).

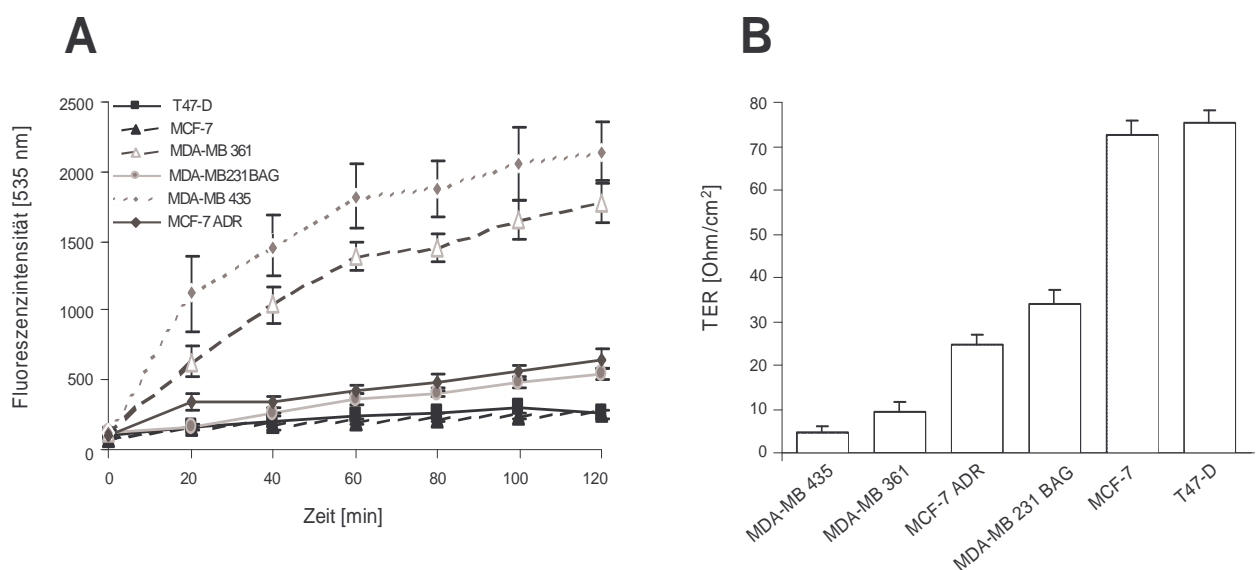


Abb.3: Funktionelle Analyse der Molekül- und Ionendurchlässigkeit von konfluenten Zellmonolayern verschiedener Brusttumorzelllinien; A) Parazelluläre Diffusionsrate von 40 kD FITC-Dextran; B) Messung der Ionenpermeabilität durch Bestimmung der transepithelialen elektrischen Resistenz (TER). Die Meßwerte wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen in Dreifachbestimmungen ermittelt (Fehlerbalken: SEM)

Wie in 3.2.2.4 und 3.2.2.5 beschrieben wurden für diese Versuche Zellen mit unterschiedlicher Zelldichte (5×10^4 bis 3×10^5 Zellen) homogen auf Membraneinsätze in Mehrfachkulturschalen ausgesät und bis zur Ausbildung eines vollständig konfluenten Zellmonolayers kultiviert. Da SK-BR 3 und MDA-MB 231 Brusttumorzellen in vitro keine geschlossen konfluenten Zellschichten ausbildeten, konnten diese beiden Zelllinien nicht in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Am Versuchstag ca. 48 h nach Einsaat der Zellen wurden die Transwellkulturen lichtmikroskopisch auf vollständige Konfluenz der Monolayer überprüft und für die anschließende Messung ausschließlich Kulturen mit optimaler Zelldichte verwendet. Um die Permeabilität der Zellmonolayer für größere Moleküle und Ionen zu bestimmen, wurde die Diffusionsrate von 40 kD FITC-

Dextran als Markermolekül sowie der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) der Zellmonolayer untersucht.

Wie in Abb.3 zu sehen ist, zeigten Claudin-1 negative MDA-MB 435 und MDA-MB 361 Zellen sowohl eine wesentlich höhere parazelluläre Diffusionsrate großer Moleküle (Abb.3 A) als auch eine höhere Ionendurchlässigkeit verglichen mit den anderen untersuchten Brusttumorzelllinien. MCF-7 ADR und MDA-MB 231 BAG Zellen mit schwacher endogener Expression von Claudin-1 Protein zeigten im Vergleich dazu eine deutlich reduzierte Diffusionsrate von 40 kD FITC-Dextran und eine Abnahme der Ionenpermeabilität. Obwohl in MCF-7 Zellen nur eine sehr geringe endogene Expression von Claudin-1 nachgewiesen werden konnte, zeigte diese Zelllinie eine mit T47-D Zellen vergleichbare hohe Reduktion der parazellulären Diffusionsrate für Ionen und Moleküle, die verglichen mit MDA-MB 361 und 435 Zellen ca. 90 % bzw. verglichen mit MCF-7 ADR und MDA-MB 231 BAG Zellen ca. 50 % betrug.

4.1.4 Expression von Tight Junction assoziierten Proteinen in Brusttumorzelllinien

Die Ergebnisse der Untersuchung des parazellulären Ionen- und Molekülfluxes in verschiedenen Brusttumorzelllinien deuteten darauf hin, daß Claudin-1 für die Funktionalität von Tight Junctions in Brusttumorzellen zwar bedeutsam ist, dennoch aber andere Faktoren die Dichtigkeit von Tight Junctions beeinflussen könnten. Um potentielle Komponenten des Tight Junction Komplexes in Brusttumorzellen zu identifizieren, wurde die Expression weiterer Tight Junction assoziierter Proteine analysiert (siehe Abb.4). Als Positiv-Kontrolle wurde Zellysate aus MDCK Zellen verwendet, welche eine hohe endogene Expression aller untersuchten Tight Junction aufweisen. Die Untersuchung ergab ein heterogenes Expressionsmuster von Tight Junction assoziierten Proteinen in HMECs und acht unterschiedlichen Brusttumorzelllinien. Die zytoplasmatischen Tight Junction Plaque Proteine ZO-1 und ZO-2 konnten in nahezu allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb.4 B). HMECs mit einer vergleichbar hohen Claudin-1 Expression wie T47-D Zellen sind Claudin-2 und -3 negativ und weisen eine geringe Claudin-4 Expression auf. Claudin-1 negative MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen, die eine hohe Tight Junction Permeabilität zeigten (Abb.3), waren bezüglich der Expression aller untersuchten transmembranösen Tight Junction Proteine ebenfalls negativ (Abb.4 A). In allen anderen Zellmodellen mit einer reduzierten parazellulären Ionen- und Molekülpassage konnten unterschiedlich hohe Expressionsniveaus von Claudin-4 und Occludin detektiert werden. T47-D und MCF-7 Zellen zeigten dabei neben einer hohen Expression dieser beiden Moleküle zusätzlich auch ein hohes Expressions-niveau von Claudin-3. Zudem wurde nachgewiesen, daß die Expression von Claudin-3 und Claudin-4 in

einigen Brusttumorzelllinien gegenüber normalen Brustepithelzellen (HMECs) deutlich erhöht ist. Claudin-2 konnte in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

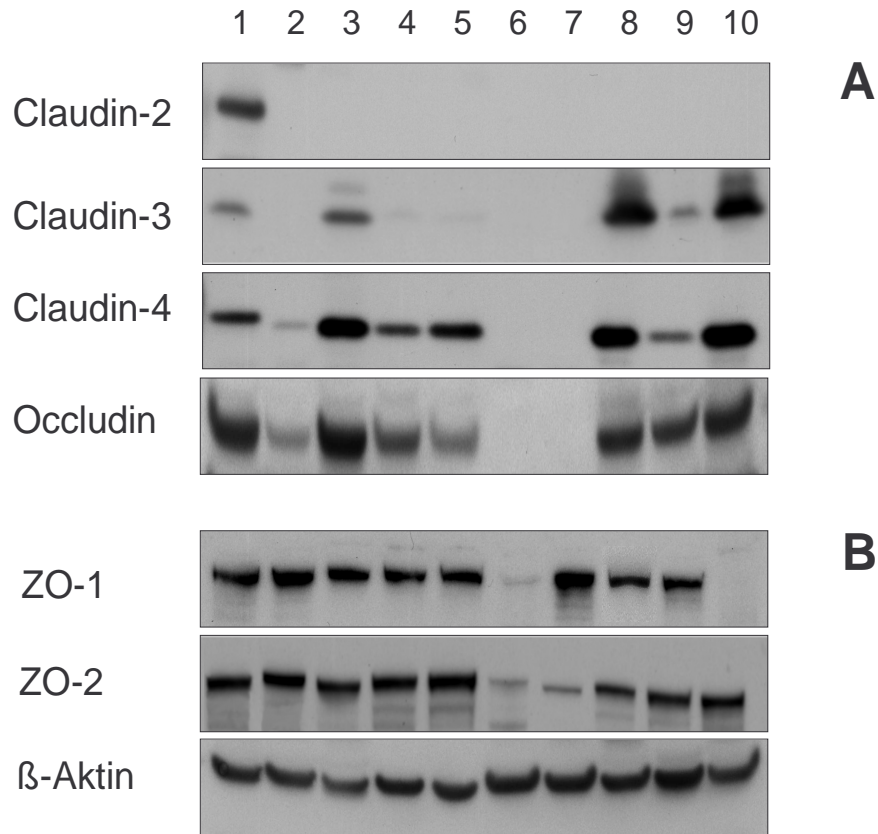


Abb.4: Western-Blot Analyse der Expression Tight Junction assoziierter Proteine in HMECs und acht verschiedenen Brusttumorzelllinien. 1: Positiv-Kontrolle MDCK ; 2: HMEC; 3: T47-D; 4: MDA-MB 231 BAG; 5: MDA-MB 231; 6: MDA-MB 435; 7: MDA-MB 361; 8: MCF-7; 9: MCF-7 ADR; 10: SK-BR 3; A) Tight Junction Membranproteine Claudin-2, -3, -4 und Occludin; B) Intrazelluläre Tight Junction Plaque Proteine ZO-1 und ZO-2. Beta-Aktin diente als interne Ladekontrolle.

4.2 Bedeutung von Claudin-1 in der Tumorgenese

Die vorliegenden Daten deuteten darauf hin, daß der Verlust der Claudin-1 Expression neben anderen integralen Membranproteinen des Tight Junction Komplexes für eine erhöhte parazelluläre Diffusionsrate von Molekülen in Brusttumorzellen von Bedeutung sein könnte. Um die physiologische Rolle von Claudin-1 im Tumorgeneseprozess besser verstehen zu können, wurde Claudin-1 durch retroviralen Gentransfer in Brusttumorzellen eingebracht und die artifizielle Reexpression von Claudin-1 untersucht. Da einige der untersuchten Brusttumorzelllinien ein komplexes Expressionsmuster anderer Tight Junction assoziierter Proteine zeigten und diese Faktoren möglicherweise die Phänotypausprägung der Claudin-1 Reexpression maskieren könnten, wurden für die folgenden Studien MDA-MB 361 Zellen als Brusttumorzellsystem verwendet. Wie in Abb.4 gezeigt konnte in diesem Zellmodell weder Claudin-1 noch andere untersuchte transmembranöse Tight Junction Proteine wie Claudin-2, -3, -4 und Occludin nachgewiesen werden.

4.2.1 In vitro Charakterisierung in Brusttumorzellen

4.2.1.1 Expression von Claudin-1 in Claudin-1 retroviral transduzierten Brusttumorzellen

Unter Verwendung von Retroviruskonstrukten, die den offenen Leserahmen (ORF) des humanen Claudin-1 Gens nach einem CMV Promotor enthielten, wurde aus parental MDA-MB 361 Zellen durch retrovirale Transduktion eine Claudin-1 positive Zellpopulation generiert (173, 174). Mit Hilfe eines L-NGFR Oberflächenmarkers auf den transduzierten Zellen konnten ohne biochemischen Selektionsdruck Claudin-1 positive Tochterzellklone mit stabiler Claudin-1 Expression isoliert werden. Zusätzlich wurde eine MDA-MB 361 „mock“ Zellklonpopulation hergestellt, die das Retroviruskonstrukt ohne Claudin-1 ORF Kassette enthielt und in den durchgeführten Versuchen als negativ-Kontrolle diente. Aus den bezüglich Expression und Lokalisation von Claudin-1 charakterisierten Tochterzellklonen wurden für die zellphysiologische Untersuchungen zwei Zellklone gewählt, die eine vergleichbar hohe artifizielle Claudin-1 Expression wie die endogen Claudin-1 positive T47-D Zelllinie zeigten. In einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnte ermittelt werden, daß praktisch alle Zellen der Klon 2 als auch der Klon 6 Zellpopulation eine hohe Expression von Claudin-1 aufwiesen, während die mock Zellkultur lediglich eine sehr schwache Hintergrundfärbung zeigte (siehe Abb.6, A-C). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Expression des Oberflächenmarkerproteins L-NGFR selbst nach Langzeitkultivierung der mock, Klon 2 und Klon 6 Zellpopulationen von bis zu 6 Monaten in einer durchflußzytometrischen Analyse immer noch über 95 % betrug. Wie in Abb.6

B und C zu sehen ist, unterschieden sich jedoch die beiden Claudin-1 positiven Zellklonpopulationen bezüglich der subzellulären Lokalisation von Claudin-1. Die Klon 6 Zellpopulation zeigte eine netzwerkartige Lokalisation von Claudin-1 ausschließlich an der Zytoplasmamembran, während in den Zellen der Klon 2 Zellpopulation ein hohes Ausmaß zytoplasmatischer Claudin-1 Färbung mit nur punktuell vorhandener Membranlokalisation sichtbar war.

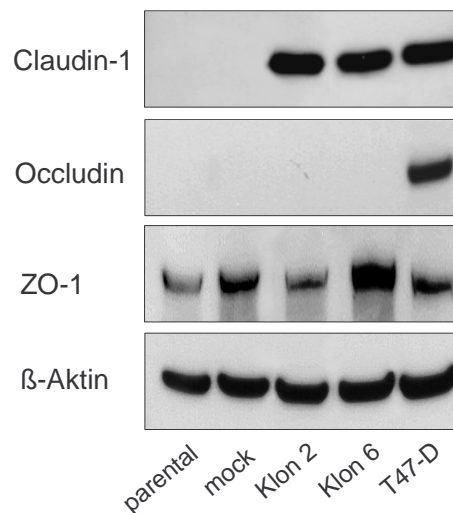


Abb.5: Western-Blot Analyse der Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 in Claudin-1 retroviral transduzierten MDA-MB 361 Zellklonpopulationen. T47-D Zellysat wurde als Positiv-Kontrolle für den Nachweis aller 3 Proteine verwendet.

Die Western-Blot Analyse der Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 in parentalen und mock MDA-MB 361 Zellkulturen sowie den ausgewählten Claudin-1 retrovirale transduzierten Zellklonen 2 und 6 ist in Abb.5 gezeigt. Es ist ersichtlich, daß die Reexpression von Claudin-1 nicht zu einer Reexpression von Occludin führte. Allerdings fiel auf, daß Klon 6 etwas größere Mengen ZO-1 im Vergleich zu Klon 2, parentalen und mock MDA-MB 361 Zellen exprimierte.

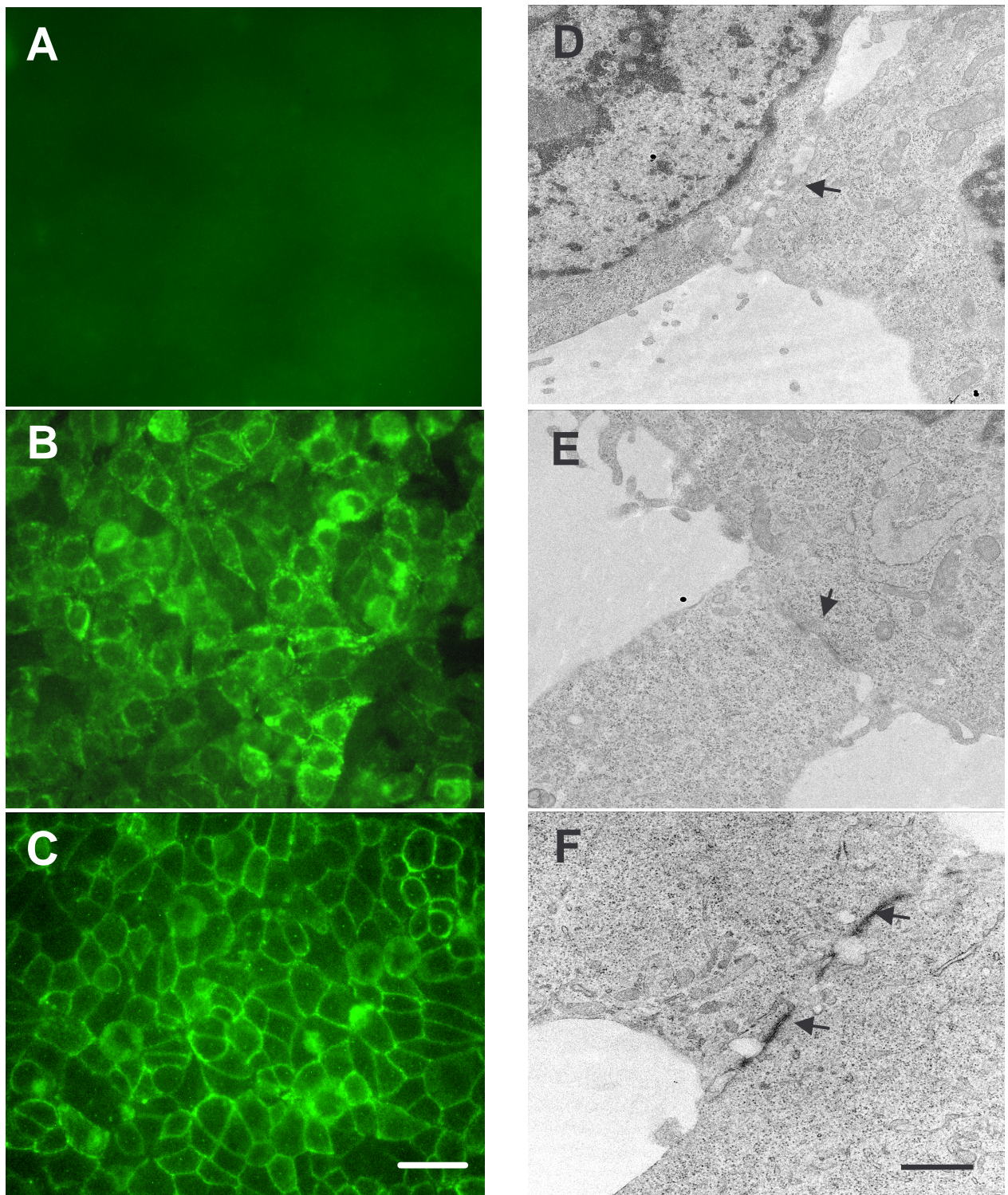


Abb.6: A) Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Claudin-1 Expression und Lokalisation in Claudin-1 retroviral transduzierten MDA-MB 361 Zellklonpopulationen; A: mock Kontrolle; B: Klon 2; C: Klon 6; Balken: 20 μm ; B) Transmissionselektronenmikroskopie der Zell-Zellkontakte in Claudin-1 retroviral transduzierten MDA-MB 361 Zellklonen D: mock Kontrolle; E: Klon 2; F: Klon 6; Balken: 1 μm .

4.2.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Claudin-1 Reexpression

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Ultrastruktur der Zell-Zellkontakte in der mock Zellkultur und den beiden Claudin-1 positiven Zellklonpopulationen untersucht (siehe Abb.6 D-E). Die mock transduzierten Zellen zeigten lediglich lose ausgebildete, schwach kontrastierte Zell-Zellkontaktstellen mit nur wenigen Berührungspunkten der Zytoplasmamembranen benachbarter Zellen sowie größeren parazellulären zellfreien Bereichen. In der Claudin-1 positiven Klon 2 Zellpopulation wurden im Vergleich zu den mock Zellen stärker kontrastierte und besser ausgebildete Zell-Zellkontakte zwischen Nachbarzellen beobachtet, die jedoch von lückenhaften Bereichen unterbrochen waren. Die Klon 6 Zellklonpopulation zeichnete sich dadurch aus, daß die Zellmembranen benachbarter Zellen sehr eng aneinanderlagen und sich als kontrastreiche Strukturen darstellten, was auf eine extrem hohe Proteindichte an der Plasmamembran von Zell-Zellkontakten hindeutete.

Furuse et al. (69) hatten in elektronenmikroskopischen Analysen unter Verwendung der Replika-technik gezeigt, daß Maus L-Fibroblasten nach Überexpression von FLAG-Tag markierten murinem Claudin-1 kontinuierliche Tight Junction ähnlichen Strangstrukturen ausbildeten, wobei allein die homophile Interaktion einzelner Claudin-1 Moleküle in der Plasmamembran für die Formation dieser polymeren Strangstrukturen verantwortlich zu sein schien. Um zu untersuchen, ob die in Klon 6 MDA-MB 361 Zellen detektierte hohe Proteinkonzentration und Lokalisation von Claudin-1 an Zell-Zellkontakten mit der Ausbildung von Tight Junction ähnlichen Strukturen einhergeht, wurden konfluente Zellen mit der Gefrierbruch/Gefrierätztechnik (Freeze Fracture) aufgearbeitet (siehe 3.2.7.4). Bei der Freeze Fracture Methode werden schockgefrorene Zellen im Vakuum gebrochen und die Oberflächen durch Sublimation von Eis freigelegt, wobei bevorzugt Lipiddoppelschichten aufbrechen und dadurch die Darstellung von Molekülkomplexen in Zytoplasmamembranen möglich wird. Dabei wird nicht das biologische Material selbst, sondern ein Metallabdruck des Oberflächenreliefs der Zellen, die sogenannte Replika elektronenmikroskopisch analysiert. In Abb.7 sind Aufnahmen eines Replikaausschnittes von mock (Bild A) und Klon 6 (Bild C) Zellen gezeigt, die eine gut erhaltene Ultrastruktur der Zellen nach Aufarbeitung demonstrieren.

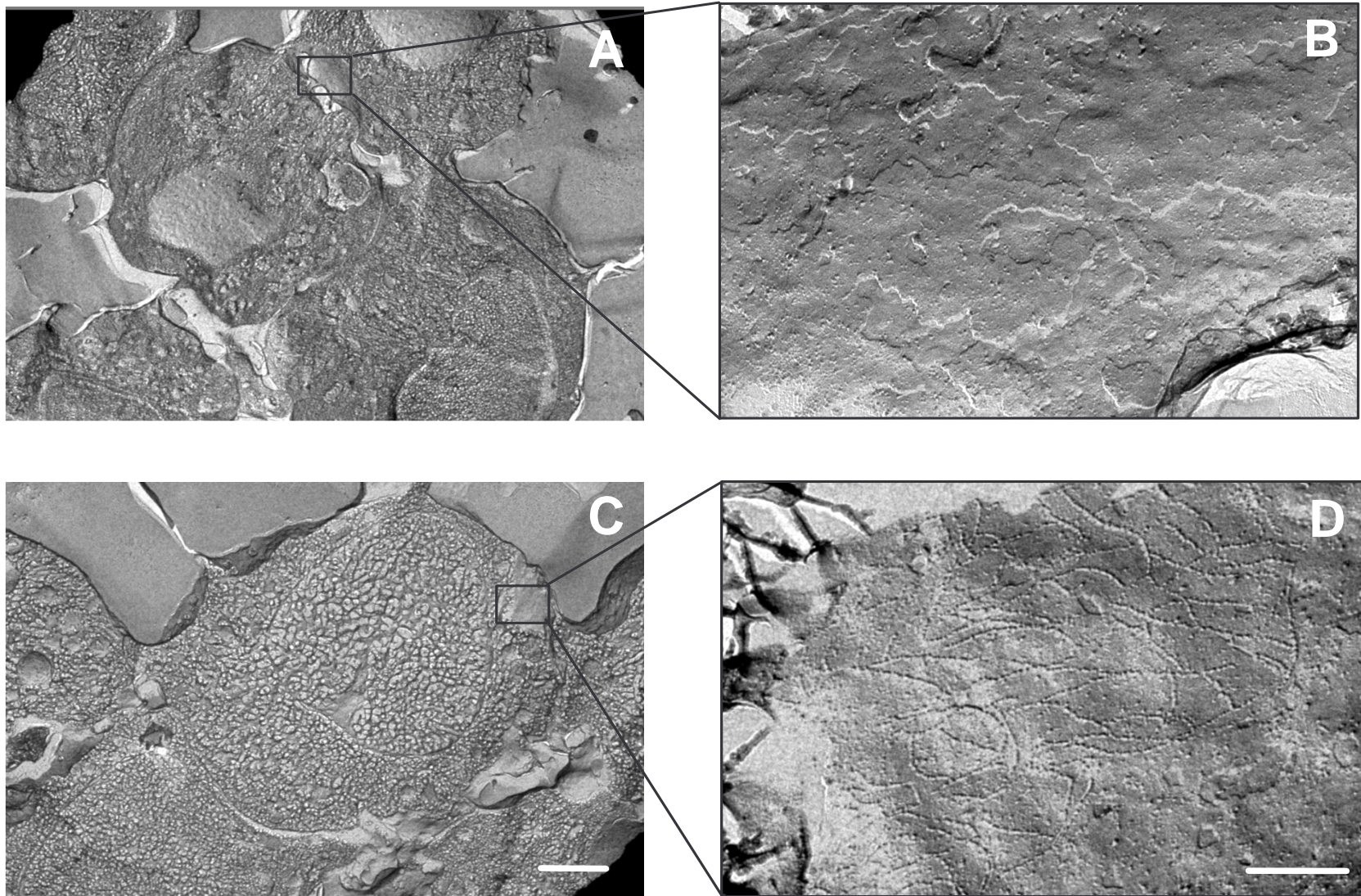


Abb.7: A) Elektronenmikroskopische Untersuchung der Zell-Zellkontakte mit Hilfe der Replikatechnik in MDA-MB 361 mock (Bild A/B) und Klon 6 (Bild C/D) Zellen. Die Bilder A und C zeigen eine Übersicht der untersuchten Metallabdrücke. Rechtecke in beiden Bildern markieren jeweils den Bildausschnitt mit höherer Vergrößerung in den Bildern B und D. Balken A/C: 2,5 μm ; Balken B/D: 250 nm.

In beiden Gruppen wurden Plasmamembranflächen an 32 potentiellen Zell-Zellkontakten analysiert. Abb.7 B zeigt exemplarisch die freigelegte Plasmamembranfläche einer Kontaktstelle zwischen 2 mock Zellen mit hoher Vergrößerung. Auf diesem Bildausschnitt sind die innere (P-Profil) und äußere Lipidschicht (E-Profil) der Plasmamembran mit unregelmäßig verteilten punktuellen Strukturen zu erkennen, wobei es sich sehr wahrscheinlich um unstrukturiert verteilte integrale Membranproteine handelt. Keine der untersuchten Plasmamembranflächen von mock Zellen wies Tight Junction ähnliche Strukturen auf. Im Gegensatz dazu konnten in Klon 6 Zellen wie in Abb.7 D gezeigt in 8 von 32 untersuchten Membranbruchflächen Tight Junction ähnliche Strukturen dokumentiert werden. Die nachgewiesenen strangartigen Strukturen setzten sich aus perlschnurartig aneinandergereihten integralen Membranpartikeln zusammen, die in Tight Junctions typischerweise für eine „Vernietung“ benachbarter Zellmembranen sorgen. Dabei waren die Tight Junction ähnlichen Strukturen in Klon 6 Zellen nicht auf einen engen Membranbereich beschränkt, sondern in mehrfach verzweigten Reihen angeordnet und auf dem gesamten Membranabschnitt der untersuchten Zell-Zellkontaktstellen zu finden.

4.2.1.3 Analyse des parazellulären Molekülfluxes in Abhängigkeit von der Claudin-1 Expression

Inai et al. hatten gezeigt, daß die Überexpression von murinem myc-Tag markiertem Claudin-1 zu einer Abnahme des parazellulären Fluxes von 40 kD und 4 kD FITC-Dextran im MDCK Hunde-Zellmodell führt (94). Die Fragestellung der folgenden Untersuchung war, ob die Reexpression von Claudin-1 in Claudin-1 und Occludin negativen humanen MDA-MB 361 Zellen zur Ausbildung einer funktionellen Diffusionsbarriere für Moleküle führt. Dazu wurde die parazelluläre Fluxkinetik von Markermolekülen mit einem Molekulargewicht von 0.3, 3 bzw. 40 kD gemessen. Die Untersuchung wurde mit Claudin-1 transduzierten Klone 2 und Klon 6 Zellkulturen sowie mit mock Zellen als Kontrolle durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt.

Klon 6 Zellen, in denen eine membranständige Expression von Claudin-1 mit rekonstituierten Tight Junction ähnlichen Strukturen gefunden wurde, zeigten nach 60 min eine verzögerte Fluxkinetik für Moleküle bis 300 Da im Vergleich zur mock Kontrolle, wobei die Fluxinhibition für 40 kD Moleküle deutlich größer war als für Moleküle mit einem Molekulargewicht 3 kD bzw. 0.3 kD Moleküle. Der durchschnittliche Fluoreszenzwert der von 60 bis 270 min gemessenen Proben war im Vergleich zur mock Kontrolle um 36 % reduziert. Der gleiche Trend war bei Klon 2 Zellen mit vorwiegend zytoplasmatischer Expression von Claudin-1 erkennbar, jedoch war die Fluxrate höher im Vergleich zu Klon 6 Zellen. Hier war der durchschnittliche Fluoreszenzwert entnommener Proben verglichen mit der mock Kontrolle um etwa 17 % verringert.

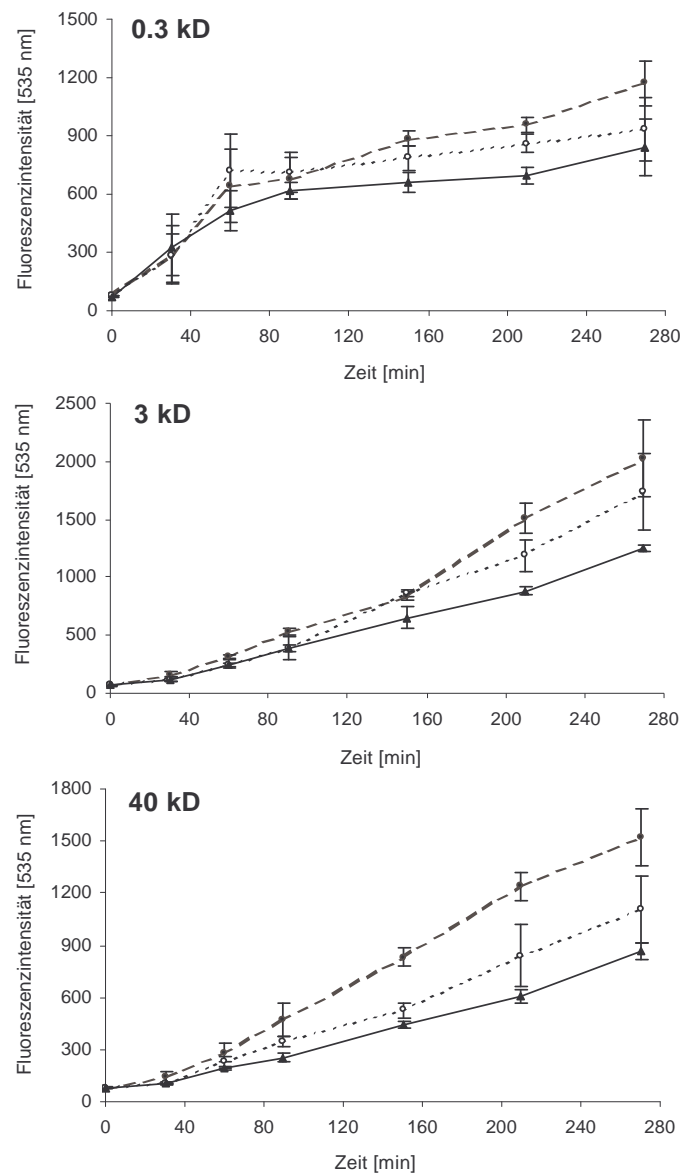


Abb.8: Analyse der parazellulären Diffusionskinetik für Fluorescein (0.3 kD), und Fluorescein markierten Dextranmolekülen (3 kD bzw. 40 kD) in MDA-MB 361 Zellen: mock Kontrolle (gestrichelte Linie), Claudin-1 positive Klon 2 (gepunktete Linie) und Klon 6 Zellen (durchgezogene Linie). Die Meßwerte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Vierfachbestimmungen; Fehlerbalken: \pm SEM.

4.2.1.4 Claudin-1 abhängiger Zelltod in MDA-MB 361 Sphäroid (3D) Zellkulturen

Um die Bedeutung des Tight Junction Proteins Claudin-1 im Tumorgeneseprozess zu verstehen, wurde die Zellproliferation und der Zelltod in Abhängigkeit von Claudin-1 Expression in MDA-MB 361 Zellen vergleichend in 2D Monolayerkultur und 3D Suspensionskultur analysiert. Eine durchflußzytometrische Untersuchung der Zellzyklusverteilung in MDA-MB 361 mock- und Claudin-1 transduzierten Klon 2 und Klon 6 adhären, subkonfluenten 2D Zellkulturen ergab ähnliche Proliferationsraten innerhalb der Zellpopulationen mit ca. 25 % aller Zellen in der S/G2M Phase. In Abb.9 sind exemplarische Bilder von mock- und Claudin-1-transduzierten

Zellen in 2D Monolayerkulturen zusammengestellt. Wie in der Bilderspalte links erkennbar, konnten keine signifikanten morphologischen Unterschiede bzw. ein kontaktinhibiertes Wachstum nach Claudin-1 Expression in MDA-MB 361 Zellen festgestellt werden. Durch Markierung toter Zellen mit Propidium Iodid (PI) (Bilderspalte rechts, weisse Pseudofarbe) wurde außerdem gezeigt, daß die Reexpression von Claudin-1 sowohl in subkonfluenten als auch in dicht konfluenten Bereichen nicht zu einer erhöhten Zelltodrate in 2D Monolayerkulturen führt. Unabhängig von der Claudin-1 Expression wurden 5-15 PI-positive Zellen pro Bild detektiert, was einem Anteil von ca. 1-3 % der gesamten Zellpopulation entspricht. Zusätzlich konnte in Zellzyklusanalysen kein erhöhter SubG1 Peak Anteil, welches als Maß für eine erhöhte Zelltodrate gilt, für Claudin-1 exprimierende MDA-MB 361 Zellen in adhärenter Zellkultur gemessen werden.

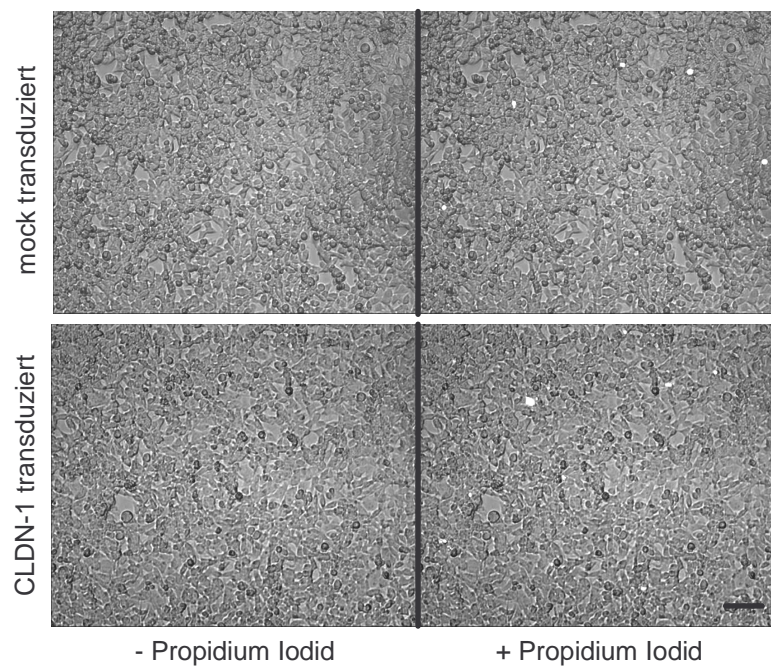


Abb.9: Analyse des Zelltodes von MDA-MB 361 mock- und Claudin-1-transduzierten Zellen (Klon 6) in 2D Monolayerkultur. Die Bilder zeigen exemplarisch subkonfluente und konfluente Areale beider Zellklone ohne bzw. mit Markierung toter Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidium Iodid (C, D). Die weissen Punkte in den rechten Bildern zeigen die gefärbten Zellkerne toter Zellen an; Balken: 100 μ m.

Um den Effekt der Claudin-1 Reexpression auf Zelltod und Zellproliferation in dreidimensional wachsenden Tumoren in vitro zu simulieren, wurden multizelluläre Sphäroidkulturen als Tumormodelle etabliert (171, 175). Dazu wurden mock- und Claudin-1-transduzierte MDA-MB 361 Zellen in Mehrfachkulturschalen ausgesät, die mit Poly-Hydroxymethacrylat (Poly-HEMA) beschichtet waren, um die Adhärenz der Zellen komplett zu unterbinden (siehe 3.2.2.1). Es konnte beobachtet werden, daß alle MDA-MB 361 Zellpopulationen bereits nach einer kurzen Kulturdauer von 5 h kleine Zellaggregate aus 3-4 Zellen ausbildeten. Innerhalb von 4-6 Tagen entwickelten sich aus diesen kleinen Zellclustern sowohl durch Zellaggregation als auch durch Zellproliferation multizelluläre Tumorsphäroide mit einem Durchmesser von ca. 20-50 Zellen. Abb.11 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen von je drei verschiedenen Sphäroiden aus MDA-MB 361 mock- und Claudin-1 transduzierten Klon 6 Sphäroidkulturen nach einer Kulturdauer von 6 Tagen.

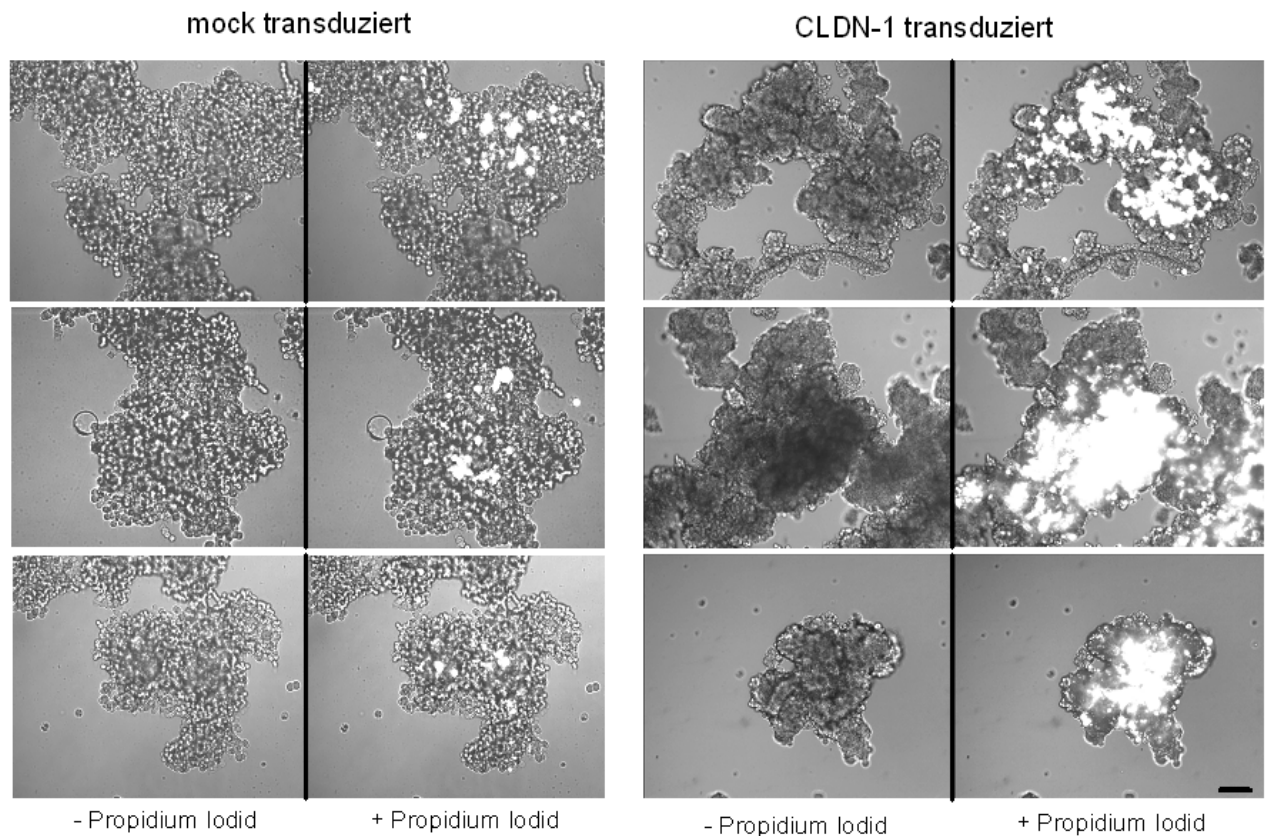


Abb.10: Analyse des Zelltodes von MDA-MB 361 mock- und Claudin-1-transduzierten Zellen (Klon 6) in 3D Sphäroiden nach 6 Tagen Wachstum in Suspensionskultur. Die Bilder zeigen je drei exemplarische Sphäroide mit bzw. ohne Propidium Iodid (PI) Gegenfärbung zur Markierung toter Zellen. Die weisse Pseudofarbe in den rechten Bildern zeigt dabei jeweils Sphäroidbereiche mit toten Zellen an; Balken: 100 μ m.

Es war zu erkennen, daß die Claudin-1 positiven Sphäroide eine kompaktere Struktur mit einer dichteren Zellpackung im Vergleich zu Claudin-1 negativen Sphäroiden aufwiesen. Jedoch konnten während des Beobachtungszeitraumes von 6 Tagen keine deutlichen Unterschiede zwischen mock-transduzierten und Claudin-1 transduzierten Tumorsphäroiden bezüglich der Sphäroidgröße festgestellt werden. Die Zellzyklusanalyse zeigte auch nach bis zu 6 Tagen Kulturdauer keine signifikanten Unterschiede in den Proliferationsraten der mock und Claudin-1 transduzierten Tumorsphäroidzellen. Dabei betrugen die Zellfraktion der G1-, S- und G2M Phase jeweils 81.9, 9.0 und 9.1 % (mock-Kontrolle) bzw. 80.1, 7.9 und 11.9 % (Claudin-1 positive Zellen). Wie in Abb.11 erkennbar ist, wiesen sowohl Claudin-1 positive als auch Claudin-1 negativ Sphäroiden vorwiegend in zentralen Bereichen der Sphäroide PI-positive Zellen auf, der jedoch in Claudin-1 positiven Tumorsphäroiden drastisch erhöht war. Allerdings zeigten Claudin-1 positive Tumorsphäroide verglichen mit der mock-transduzierten Kontrolle eine signifikant erhöhte Zahl toter Zellen in zentralen Sphäroidbereichen. Um zu verstehen, inwieweit der Volumenanteil toter Zellen im Sphäroidzentrum in Claudin-1 negativen und positiven Sphäroiden von der Gesamtgröße bzw. Volumen des Sphäroids abhängt, wurden MDA-MB 361 mock-transduzierte und Claudin-1 transduzierte Klon 6 Sphäroide mit unterschiedlicher Größe untersucht (Abb.11).

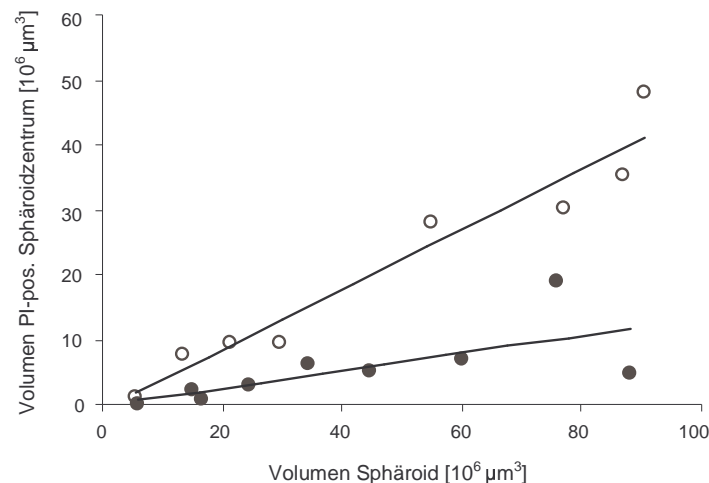


Abb.11: Volumenabhängige Zelltodanalyse in MDA-MB 361 Sphäroiden. Die Untersuchung wurde nach 6 Tagen Wachstum von MDA-MB 361 mock-transduzierten Zellen (schwarze Kreise) und Claudin-1-transduzierten Klon 6 Zellen (weisse Kreise) in Suspensionskultur durchgeführt.

Dazu wurden Bilder verschieden großer Sphäroide aufgenommen und jeweils der mittlere Durchmesser d des Sphäroids sowie des zugehörigen PI-positiven Sphäroidzentrums bestimmt und mit der Formel für das Kugelvolumen $V = (d^3\pi)/6$ auf das Volumen eines idealisierten kugelförmigen Sphäroid/Sphäroidbereiches extrapoliert. Abb.11 zeigt, daß die Größe des PI-positiven Sphäroidzentrums fast linear mit der Sphäroidgröße zunahm. Die zugehörigen Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden für Claudin-1 positive und mock Tumorsphäroide betrugen 0.97 bzw. 0.91. Die Steigung der Regressionsgerade für Claudin-1 positive MDA-MB 361 Sphäroide war circa um den Faktor 3 höher verglichen mit der mock Kontrolle (0.46 bzw. 0.14), was eine dreifach höhere Zelltodrate in Claudin-1 positiven Sphäroiden bedeutete. Zusätzlich war die PI-positive Zellfraktion im zentralen Sphäroidbereich unabhängig von der Sphäroidgröße in Claudin-1 positiven Sphäroiden immer größer im Vergleich zur mock Kontrolle. Diese Feststellung schließt explizit die Möglichkeit aus, daß es sich bei der erhöhten Zelltodrate in Claudin-1 positiven Sphäroiden um ein sekundäres Phänomen handelte, welches primär durch unterschiedliche Sphäroidgrößen hervorgerufen wurde.

Um zu verstehen, ob die Reexpression von Claudin-1 nekrotischen oder apoptotischen Zelltod in zentralen Sphäroidbereichen auslöst, wurden die Sphäroidzellen durch Trypsinierung vereinzelt und für durchflußzytometrische Untersuchungen mit dem Zelltodfarbstoff Propidium Iodid (PI) sowie dem Apoptosemarker Annexin V-Fluos gefärbt (siehe 3.2.6.4). Mit dieser Technik ist es möglich, in den Zellen ablaufende nekrotische und apoptotische Prozesse als Funktion der Zeit aufzulösen, da die bei Nekrose schnell auftretende massive Membranruptur lediglich zur PI-Färbung der Zellen führt, während beim vergleichsweise langsamen Apoptoseprozess zuerst eine extrazelluläre Exposition von Phosphatidylserinresten in der Zellmembran stattfindet, die mit Annexin V-Fluos detektiert werden kann. Nachdem apoptotischer Zelltod eingetreten ist, werden Annexin V-Fluos positive Zellen durch Membranruptur ebenfalls PI-positiv. Abb.12 zeigt zweidimensionale Dotplots von MDA-MB 361 mock-transduzierten (A), Claudin-1 transduzierten Klon 2 (B) und Claudin-1 transduzierten Klon 6 (C) Sphäroiden nach 5 Tagen Zellkultur.

In den mock-transduzierten Tumorsphäroiden (A) fand sich ein relativer Anteil lebend-apoptotischer Zellen von 3.7 % (Annexin positiv, PI negativ) bzw. tot-apoptotischer Zellen von 7.0 % (Annexin positiv, PI positiv) an der gesamten Sphäroidzellpopulation. Der Anteil apoptotisch/lebender und apoptotisch/toter Zellen war in Claudin-1 Klon 2 transduzierten Tumorsphäroiden (B) mit vorwiegend zytoplasmatischer Claudin-1 Lokalisation mit 9 bzw. 4.8 % in etwa mit mock-transduzierten Sphäroiden vergleichbar. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil beider Zellfraktionen in Claudin-1 Klon 6 transduzierten Tumorsphäroiden (C) mit Claudin-1 Membranlokalisation auf 8.5 bzw. 37.5 % an und war mit einem Gesamtanteil apoptotischer Zellen von 46.0 %

etwa 3.5x höher verglichen mit mock- und Klon 2 transduzierten Sphäroidkulturen. Diese Daten sind vergleichbar mit Untersuchungen der Apoptoseinduktion bis zu einer Kulturdauer von 24 Tagen in Claudin-1 Klon 6 transduzierten Tumorsphäroiden und mock-transduzierten Sphäroiden, die zeigten, daß ab Tag 10 eine Plateauphase mit 60-65 % apoptotischer Zellen an der gesamten Klon 6 Sphäroidzellpopulation erreicht wird, während des Zeitraums der Anteil apoptotischer Zellen in mock-transduzierten Sphäroiden mit 12-17 % konstant blieb (174).

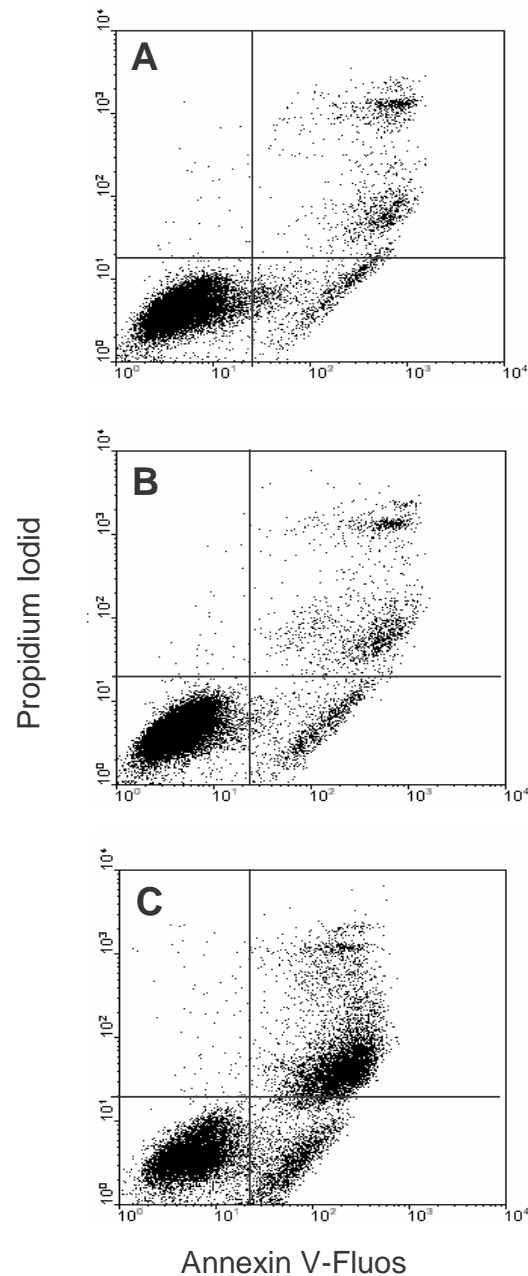


Abb.12: Durchflußzytometrische Analyse des Zelltodes in MDA-MB 361 Tumorsphäroiden. Quadrant links unten: vitale Zellpopulation; Quadrant rechts unten und oben: vital apoptotische und tot apoptotische Zellpopulation; A) mock-transduzierte Zellen; B) Claudin-1 transduzierte Klon 2 Zellen; C) Claudin-1 transduzierte Klon 6 Zellen.

4.2.2 In-vivo Charakterisierung im Maus-Xenograft Brusttumormodell

Die in vitro Studien hatten gezeigt, daß die Expression und Membranlokalisation von Claudin-1 in MDA-MB 361 Brusttumorzellen zu einer erhöhten Zelltodrate durch Apoptoseinduktion in Tumorsphäroiden führt. Ein signifikanter Unterschied von Sphäroidkulturen zur in vivo Situation besteht allerdings darin, daß in diesem System keine Gefäßversorgung abgebildet wird. Der Prozess der Neovakularisierung von Mikrotumoren stellt jedoch in-vivo einen entscheidenden Faktor für das progressive Wachstum von Tumoren dar (21). Um den Effekt der Reexpression von Claudin-1 auf das Wachstum von vaskularisierten Tumoren zu analysieren, wurde ein Tierversuch mit SCID-Mäusen als Xenograftmodell durchgeführt. Dazu wurden Claudin-1 negative mock-transduzierte MDA-MB 361 Zellen sowie Claudin-1 positive MDA-MB 361 Klon 2 (Claudin-1 vorwiegend zytoplasmatisch) und Klon 6 Zellen (Claudin-1 membranständig) als Zellmodelle verwendet, um das Tumorstadium in Abhängigkeit unterschiedlicher Qualitäten der Claudin-1 Membranlokalisation zu untersuchen (siehe Abb.6). Der Ablauf des Versuchs ist schematisch in Abb. 13 dargestellt.

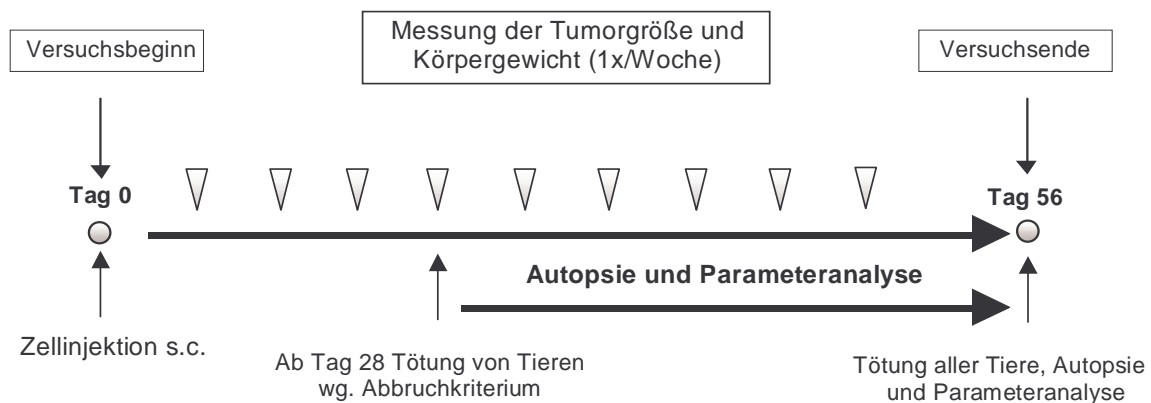


Abb.13: Überblick über den zeitlichen Ablauf des Tierversuches. Der Versuch erstreckte sich über 8 ½ Wochen von Tag 0 (subkutane Applikation der Tumorzellen) bis Tag 56 (Tötung aller überlebenden Tiere und Parameteranalyse).

Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurden 77 weibliche SCID-Mäuse in 3 Gruppen zu 1x 25 und je 2x 26 Tieren eingeteilt. Dann wurden den Tieren unter Inhalationsnarkose MDA-MB 361 mock-transduzierte Zellen (Gruppe 1, 26 Tiere) sowie Claudin-1 transduzierte Klon 2 (Gruppe 2, 25 Tiere) und Klon 6 (Gruppe 3, 26 Tiere) Zellen in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/200 μ l PBS subkutan in die rechte Flanke injiziert (siehe 3.2.4.2). Der Tag der Zellinjektion wurde als Tag 0 definiert, der Abbruch des Versuches erfolgte am Tag 56. Während des Versuches wurde

das Tumor- sowie das Körpergewicht der Tiere 1x pro Woche bestimmt. SCID-Mäuse, die das Abbruchkriterium aufgrund von exzessivem Tumorwachstum schon vor dem Tag 56 erreicht hatten (siehe dazu 3.2.4.4), wurden durch transzervikale Dislokation getötet, wonach die Tumore aus den Mäusen präpariert und analysiert wurden. Am Endpunkt des Versuchs am Tag 56 wurden alle noch lebenden Mäuse getötet und ebenso verfahren.

Die statistische Auswertung des Tumorwachstums sowie weiterer durchgeführter Analysen erfolgte mit den Software-Programmen SigmaPlot und SigmaStat (Firma SPSS, Erkrath) unter Verwendung des Student t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Messgruppen werden dabei durch den p-Wert ausgedrückt. Ist der p-Wert kleiner als 0.05, so gelten die Unterschiede der Mittelwerte als signifikant.

4.2.2.1 Tumorwachstum und Überlebensrate

Alle Tieren, denen Tumorzellen subkutan appliziert wurden, entwickelten einen messbaren Tumor, die Anwachsrate betrug dementsprechend 100 %. Die Tumorgroße wurde dabei 4x in den ersten 28 Tagen des Versuches gemessen (Tag 11, 16, 21 und 28), wobei die Anzahl n der Versuchstiere innerhalb dieses Zeitraums mit n = 26 (Gruppe 1 und 3) bzw. n = 25 (Gruppe 2) konstant blieb. Eine Wachstumskinetik der Tumore bis zum Tag 28 ist in Abb.14 A gezeigt.

Aus den Wachstumskurven geht hervor, daß es schon ab Tag 16 zu einer signifikanten Verringerung des Tumorwachstums innerhalb der Gruppe 3 Mäusekohorte kam, denen Claudin-1 positive MDA-MB 361 Klon 6 Zellen injiziert worden waren. Das mittlere Tumorgewicht der Gruppe 3 Kohorte betrug zu diesem Zeitpunkt 317.3 mg im Vergleich zu Gruppe 1 mock-tranduzierten Kohorte mit 519.7 mg und der Gruppe 2 Claudin-1 Klon 2 tranduzierten Kohorte mit 502.6 mg (p-Werte Gruppe 1-3 <0.001, Gruppe 2-3 0.005, Gruppe 1-2 0.812), was einer Wachstumsreduktion gegenüber den Kontrollgruppen von ca. 39 % (Vgl. mit Gruppe 1) bzw. ca. 37 % (Vgl. mit Gruppe 2) entsprach. Bis zum Tag 28 setzte sich dieser Trend weiter fort, wobei sich die Differenz im mittleren Tumorgewicht zwischen der Gruppe 3 Kohorte und den anderen beiden Gruppen noch einmal deutlich vergrößerte. In der Gruppe 3 war das mittlere Tumorgewicht zu diesem Zeitpunkt gegenüber den Kontrollgruppen um 56 % (Gruppe 1) bzw. ca. 58 % (Gruppe 2) reduziert und betrug 860.0 mg verglichen mit 1969.0 mg bzw. 2055.8 mg (p-Werte Gruppe 1-3 <0.001, Gruppe 2-3 <0.001, Gruppe 1-2 0.754). In einem Wiederholungsversuch mit je 8 Tieren pro Kohorte über einen Versuchszeitraum von 30 Tagen konnte dieses Ergebnis reproduziert werden. In diesem Versuch betrug das mittlere Tumorgewicht der Gruppe 3 Versuchstiere 1043.7 mg verglichen mit 2523.1 bzw. 2487.4 mg in den Gruppen 1

und 2, was in beiden Fällen einer Wachstumsreduktion der Tumoren von etwa 59 % entsprach (p-Werte Gruppe 1-3 <0.001, Gruppe 2-3 0.003, Gruppe 1-2 0.473).

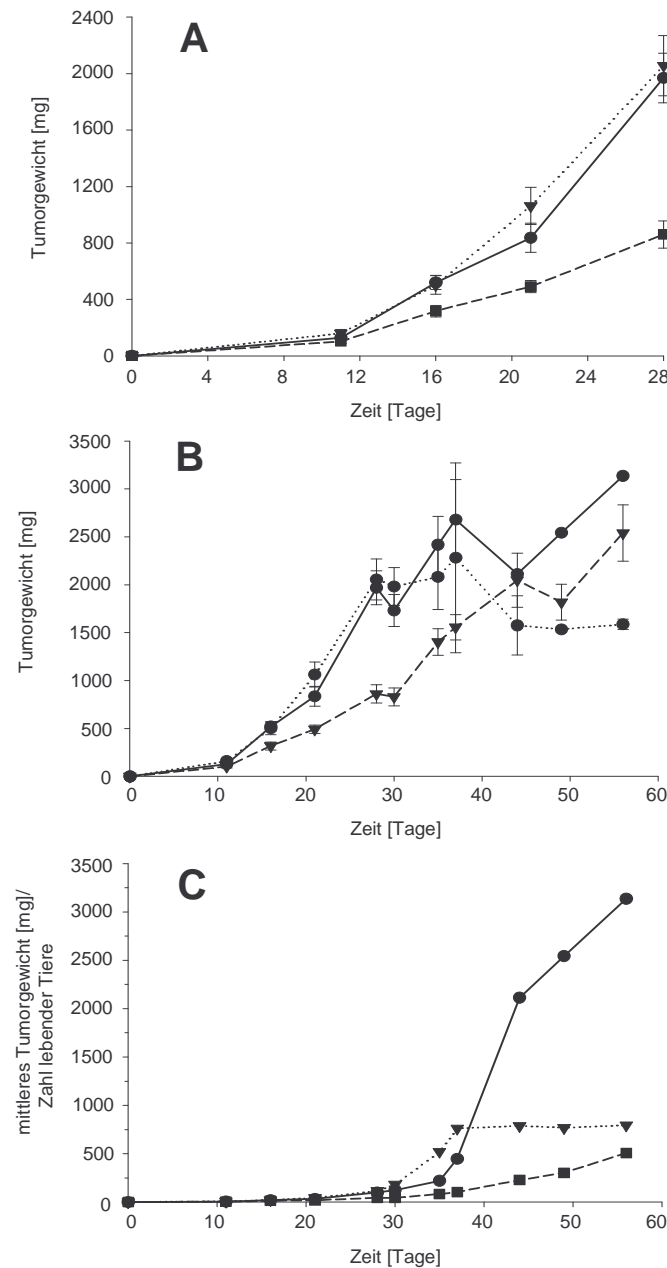


Abb.14: Wachstumskinetik von MDA-MB 361 Xenograftumoren in SCID-Mäusen. A) Tumorwachstum innerhalb der ersten 28 Tage; B) Tumorwachstum innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes von 56 Tagen; C) Normalisierung des mittleren Tumorgewichts auf die Anzahl lebender Mäuse. Durchgezogene Linie: MDA-MB 361 mock-Kontrolle (Claudin-1 negativ); Gepunktete Linie: MDA-MB 361 Klon 2 (Claudin-1 positiv, zytoplasmatisch lokalisiert); Gestrichelte Linie: MDA-MB 361 Klon 6 (Claudin-1 positiv, membranlokalisiert)

Für eine Tumoruntersuchung zu einem frühen Zeitpunkt des Versuches wurden am Tag 28 aus allen 3 Gruppen je 5 Tiere mit unterschiedliche großen Tumoren getötet. Außerdem mußten ab diesem Zeitpunkt zunehmend Tiere aus allen 3 Gruppen aufgrund des Abbruchkriteriums getötet werden, wobei nicht die Abnahme des Körpergewichts der Mäuse, sondern die Größe der Tumoren der alleinige Abbruchgrund war. Aufgrund dieses Verfahrens wurden Tiere mit großen Tumoren vor allem aus Gruppe 1 und 2 entfernt, da im Vergleich zur Gruppe 3 in diesen beiden Gruppen bereits viele Tiere große Tumoren aufwiesen. Die auf diese Weise durchgeführte Selektion der Versuchstiere führte aber dazu, daß sich der Anteil der Tiere mit kleinen Tumoren im weiteren Versuchsverlauf erhöhte, was zu einer vermeintlichen Abnahme des mittleren Tumorgewichts innerhalb der Gruppen führte, die sich besonders stark auf die Gruppen 1 und 2 auswirkte. In Abb.14 B ist die Messung des mittleren Tumorgewichts über den gesamten Versuchszeitraum von 56 Tagen gezeigt, wobei nach Tag 28 noch 5 weitere Tumorgewichtsbestimmungen am Tag 30, 35, 37, 44, 49 und Tag 56 durchgeführt wurden. Wie aus den Wachstumskurven zu entnehmen ist, kam es nach Tag 28 und 37 in den Gruppen 1 und 2 bzw. nach Tag 28 und 44 in der Gruppe 3 zu einer vermeintlichen leichten Abnahme des mittleren Tumorgewichts, die mit der Entfernung von Mäusen mit großen Tumoren aus den Kohorten zu erklären ist.

Um die Entwicklung des Tumorwachstums zu späteren Zeitpunkten darstellen zu können, wurde das mittlere Tumorgewicht auf die Anzahl noch lebender Tiere innerhalb der Kohorte normiert. Aus Abb.14 C ist zu ersehen, daß das Verhältnis von mittlerem Tumorgewicht zur Anzahl lebender Tiere, die aufgrund ihres Tumorgewichts das Abbruchkriterium noch nicht erreicht hatten, beginnend mit Tag 28 in den Gruppen 1 und 2 deutlich stärker zunahm als in der Gruppe 3, was primär durch die starke Abnahme der Zahl an Versuchstieren in den beiden Kontrollgruppen begründet war.

In Abb.15 ist die Überlebensrate der Mäuse in einer Kaplan-Meyer Survivalkurve dargestellt, wobei als Überleben der Zeitraum von Versuchsbeginn bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums definiert wurde. Der Verlauf der Kurven zeigt, daß Mäuse der Gruppe 3 Kohorte deutlich länger überlebten als die Tiere der Gruppen 1 und 2. So lebten am Tag 37 noch 15 Mäuse (ca. 72 %) der Gruppe 3 Kohorte, während nur noch 6 Tiere von Gruppe 1 (ca. 29 %) bzw. 3 Tiere von Gruppe 2 (15 %) am Leben waren. Zu Versuchsende am Tag 56 hatten 5 Mäuse (ca. 24 %) der Gruppe 3 das Abbruchkriterium noch nicht erreicht, während in Gruppe 1 noch 1 Tier (ca. 5 %) bzw. in Gruppe 2 noch 2 Tiere (10 %) lebten. Die 50 % Überlebensrate (Zeit, bei der noch 50% der Tiere leben) betrug ca. 42 Tage in der Gruppe 3 bzw. ca. 33.5 Tage in den Gruppen 1 und 2 (p-Werte mittlere Überlebensrate Gruppe 1-3 <0.001, Gruppe 2-3 0.008, Gruppe 1-2 0.940).

Die Messung des Körpergewichts der Tiere während des gesamten Versuchszeitraumes ergab unabhängig von der Kohortenzugehörigkeit eine durch das Tumorwachstum bedingte leichte Abnahme von durchschnittlich 20 g auf ca. 18 g pro Tier ab.

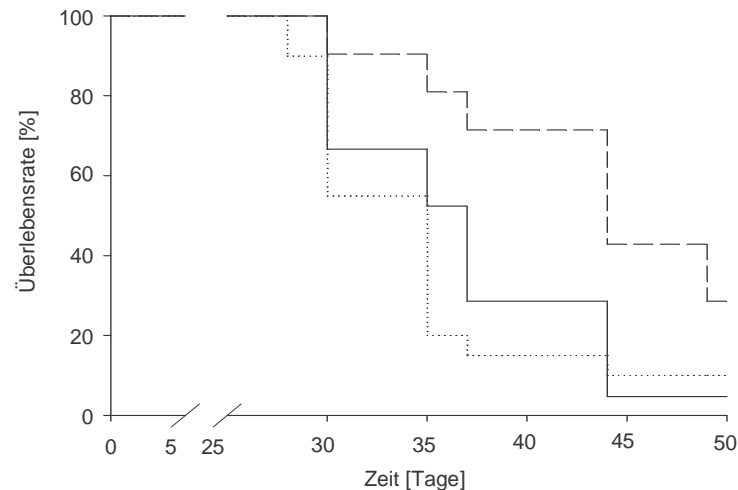


Abb.15: Kaplan-Meier Survivalkurve von MDA-MB 361 Xenograftumoren in SCID-Mäusen. Durchgezogene Linie: MDA-MB 361 mock-Kontrolle (Claudin-1 negativ); Gepunktete Linie: MDA-MB 361 Klon 2 (Claudin-1 positiv, zytoplasmatisch lokalisiert); Gestrichelte Linie: MDA-MB 361 Klon 6 (Claudin-1 positiv, membranlokalisiert)

4.2.2.2 Analyse der Expression von Claudin-1 in Xenograftumoren

Um das Expressions- und Lokalisationsmuster von Claudin-1 der verwendeten MDA-MB 361 Zellklone in den Xenograftumoren zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten mit dem Anti-Human Claudin-1 Antikörper durchgeführt mit anschließender Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt (siehe 3.2.5.2). In Abb.16 sind exemplarisch Areale von Xenograftumoren dargestellt, die aus den Gruppe 1 (A, mock-transduzierte MDA-MB 361 Zellen), Gruppe 2 (B, Claudin-1 positive Klon 2 MDA-MB 361 Zellen) und Gruppe 3 (C, Claudin-1 positive Klon 6 MDA-MB 361 Zellen) Mäusekohorten präpariert wurden. Wie bereits in vitro durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt (Abb.6 A) konnte auch in-vivo durch DAB-Färbung keine Expression von Claudin-1 in mock-transduzierten MDA-MB 361 Zellen nachgewiesen werden (Abb.16 A). Die in vitro als Claudin-1 positiv getesteten MDA-MB 361 Zellklone 2 und 6 wiesen hingegen auch in-vivo eine hohe Expression von Claudin-1 auf (Abb.16 B und C). Unabhängig von der Schnittebene des Gewebeschnittes durch den Tumor konnte in praktisch allen Tumorzellen eine Claudin-1 Expression gefunden werden. Darüberhinaus zeigte sich, daß die in vitro detektierte unterschiedliche zelluläre Lokalisation von Claudin-1 in beiden Zellklonpopulationen auch in-vivo nachzuweisen war. Abb.16 B

zeigt, daß in Gruppe 2 Tumoren eine ausgeprägte zytoplasmatische DAB-Färbung in den meisten Tumorzellen vorlag, während eine membranständige Lokalisation von Claudin-1 nur an sehr wenigen Zell-Zellkontakten zu finden war. Hingegen konnte in den Tumorzellen der Gruppe 3 Tumoren eine ausschließlich auf Zell-Zellkontakte konzentrierte, feine membranständige DAB-Färbung nachgewiesen werden, welche mit dem in vitro Lokalisationsmuster von Claudin-1 in MDA-MB 361 Klon 6 Zellen übereinstimmte (Abb 6 C).

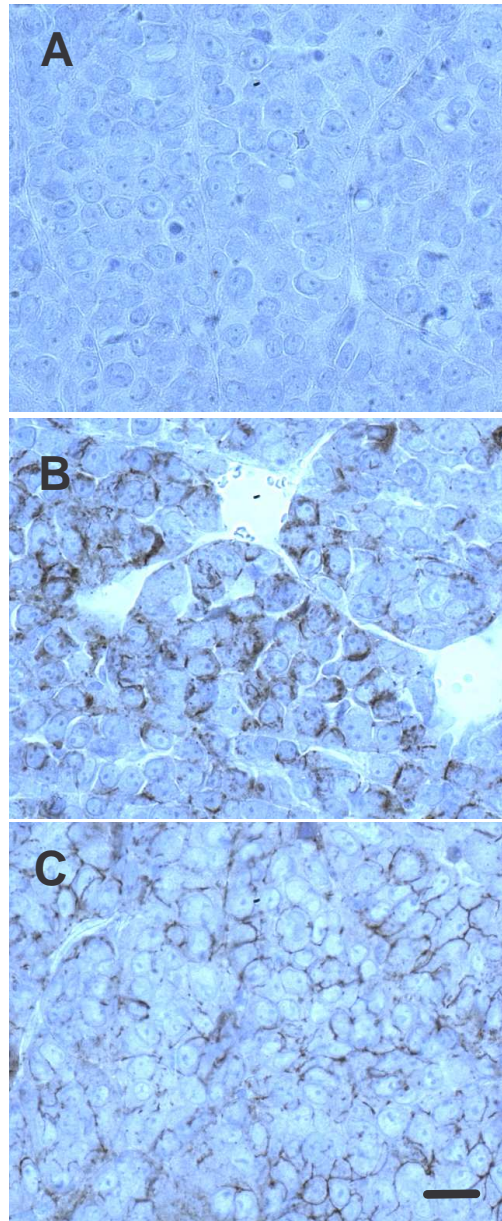


Abb.16: Expression und Lokalisation von Claudin-1 in MDA-MB 361 Xenograftumoren. A) MDA-MB 361 mock-Kontrolle (Claudin-1 negativ); B) MDA-MB 361 Klon 2 (Claudin-1 positiv, zytoplasmatisch lokalisiert); C) MDA-MB 361 Klon 6 (Claudin-1 positiv, membranlokalisiert) Balken: 20 μ m

4.2.2.3 Durchflußzytometrische Analyse der Xenograftumoren

Das Ergebnis der Untersuchung des *in vivo* Tumorwachstums war, daß Claudin-1 positive Tumore mit membranständiger Claudin-1 Lokalisation ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum im Vergleich zu Claudin-1 negativen und Claudin-1 positiven Tumoren mit primär zytoplasmatischer Claudin-1 Lokalisation zeigten. Um zu untersuchen wie die Tumorwachstumsreduktion mit der Zelltodrate, Proliferationsrate und Vaskularisierung der Tumore korreliert, wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen und nach Fixation der Zellen durchflußzytometrische Analysen durchgeführt. Um gleichzeitig die Zellzyklusverteilung und den apoptotischen Anteil der Tumorzellen zu bestimmen, wurde eine DNA-Färbung mit H33258 sowie eine FITC-Markierung von DNA-Fragmenten unter Verwendung der TUNEL-Reaktion durchgeführt (siehe 3.2.6.5 und 3.2.6.6).

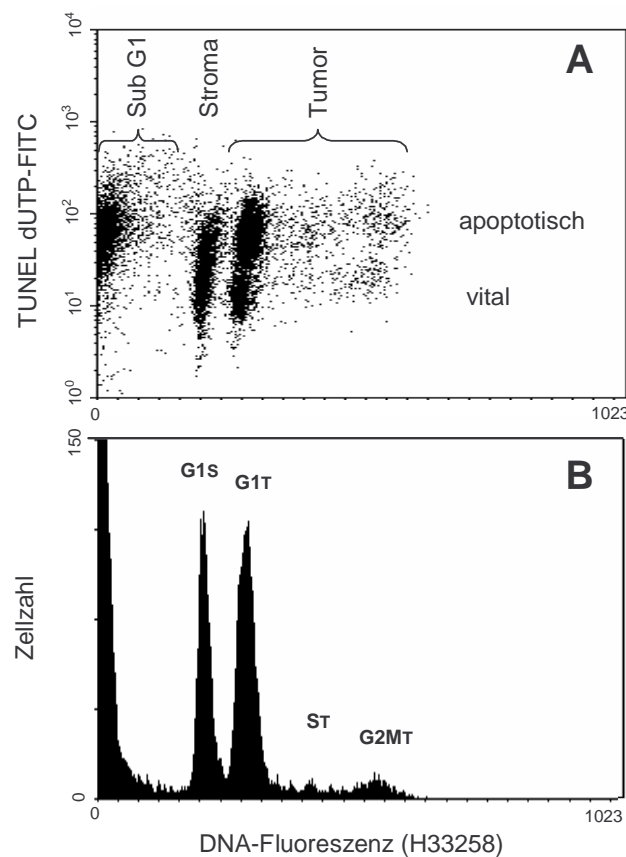


Abb.17: Durchflußzytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung, des Anteils apoptotischer Zellen und des Stromaanteils in MDA-MB 361 Xenograftumoren. A) Zellzyklus- und TUNEL-Analyse (x-Achse: DNA-Farbstoff H33258 und y-Achse: FITC-dUTP). B) DNA Histogramm zur Darstellung von Tumor- und Stromazellzyklus in den Xenograftumoren. Tumorzellzyklus (G1T, ST und G2MT), Stromazellen (G1S) und SubG1 Region als relatives Maß für den Anteil nekrotischer plus apoptotischer Zellkernfragmente.

Wie in Abb.17 B gezeigt ist, ermöglicht die Zellzyklusverteilung eine Unterscheidung zwischen normal diploiden Maus-Stromazellen und den aneuploiden humanen Tumorzellen aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts möglich. In Abb.17 A ist exemplarisch ein zweidimensionaler Dotplot gezeigt, der die durchgeführte 2-Parameteranalyse veranschaulicht. Durch die DNA-Färbung mit H33258 (x-Achse) läßt sich der prozentuale Anteil der Stromazellen in der G1-Phase sowie die Anteile der Tumorzellen in G1-, S-, G2M-Phase des Zellzyklus ermitteln. Die dabei erhaltenen Werte ergeben sowohl den relativen Anteil von Mauszellen in den Tumoren, welcher mit der Zahl eingewanderter Mausendothelzellen und Entzündungszellen korreliert, als auch den relativen Anteil von S- und G2M-Zellen als Maß für die Proliferationsrate der Tumorzellen. Die SubG1 Region repräsentiert den Anteil fragmentierter Zellkerne, welcher als relatives Maß für nekrotisch plus apoptotisch aufgetretenen Zelltod in den Xenografttumoren herangezogen werden kann. Speziell aus apoptotischen Prozessen hervorgegangener Zelltod wird mit Hilfe der TUNEL-Technik detektiert. Dabei wird die Endonukleaseaktivität in apoptotischen Zellen durch Polymerisation von dUTP-FITC (y-Achse) an 3'-OH Enden von DNA-Bruchstücken nachgewiesen. Nach Festlegung eines Schwellenwerts der dUTP-FITC Färbung konnte somit der Anteil vitaler und vital apoptotischer Tumorzellen im Tumor bestimmt werden.

4.2.2.4 Claudin-1 abhängige Apoptose-/Zelltodinduktion

In Abb.18 ist jeweils der mittlere Anteil TUNEL-positiver Tumorzellen (A) und SubG1 Region Tumorzellen (B) aller gemessenen MDA-MB 361 Xenografttumore der 3 Gruppen dargestellt.

Daraus ist ersichtlich, daß der Anteil lebend apoptotischer und toter Zellen in den Tumoren der Gruppe 3 Kohorte im Vergleich zu den Tumoren der Gruppen 1 und 2 um den Faktor 6.3 bzw. 4.6 erhöht war. Dabei betrug der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Tumorzellen in den Gruppe 3 Tumoren 13.8 % verglichen mit 3.0 und 2.2 % in Gruppe 1 und 2 Tumoren (p-Werte Gruppe 1-3 0.006, Gruppe 2-3 0.005, Gruppe 1-2 0.460). Der prozentuale Anteil von SubG1 Tumorzellen, der sich sowohl aus nekrotisch als auch apoptotisch toten Zellen zusammensetzt, war in den Tumoren der Gruppe 3 ebenfalls erhöht und betrug 14.1 % im Vergleich zu 7.7 % und 5.5 % in den Tumoren der Gruppen 1 und 2 (p-Werte Gruppe 1-3 0.010, Gruppe 2-3 0.010, Gruppe 1-2 0.260), was einer Erhöhung um den Faktor 1.8 bzw. 2.7 entspricht.

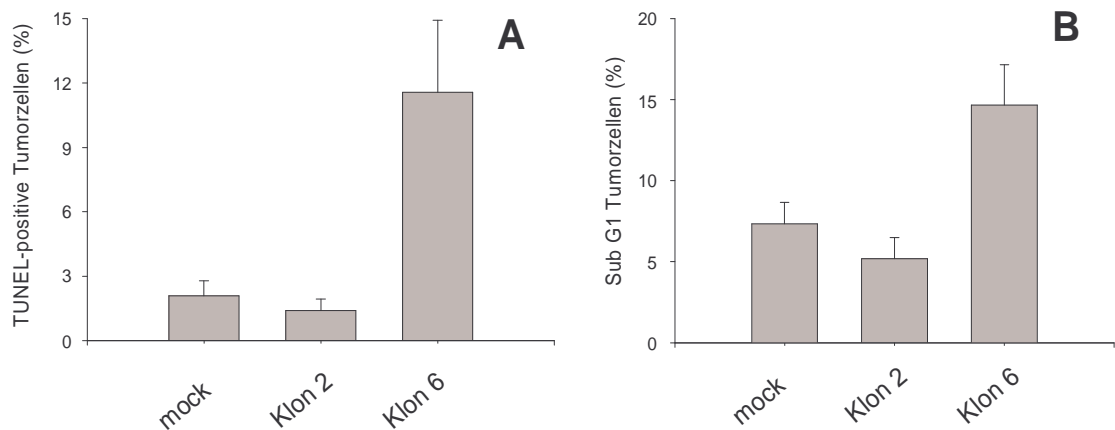


Abb.18: Analyse des Anteils apoptotischer Zellen und fragmentierter Zellkerne in MDA-MB 361 Xenografttumoren. A) TUNEL-positive Zellfraktion; B) Zellfraktion in der SubG1 Region. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aller Tumore nach Erreichen des Abbruchkriteriums bzw. Versuchsende.

4.2.2.5 Proliferation der Brusttumorzellen in den Xenografttumoren

Aufgrund des verringerten Tumorwachstums von Gruppe 3 Tumoren verglichen mit den Tumoren von Gruppe 1 und 2 war zu erwarten, daß in diesen Tumoren auch der relative Anteil proliferierender Tumorzellen verringert sein mußte. Wie in Abb.19 A gezeigt ist, war jedoch in den Tumoren von Gruppe 3 Tieren trotz des verlangsamten Wachstums und der erhöhten Zelltodrate paradoxerweise gleichzeitig eine erhöhte Proliferationsrate der Tumorzellen um den Faktor 2.9 bzw. 1.7 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen zu beobachten. So betrug der SG2M-Phasenanteil der Zellzyklusverteilung in Gruppe 3 Tumoren 17.1% im Vergleich zu 10.3 und 6.0 % in Gruppe 1 und 2 Tumoren (p-Werte Gruppe 1-3, 2-3 und 1-2 je <0.001).

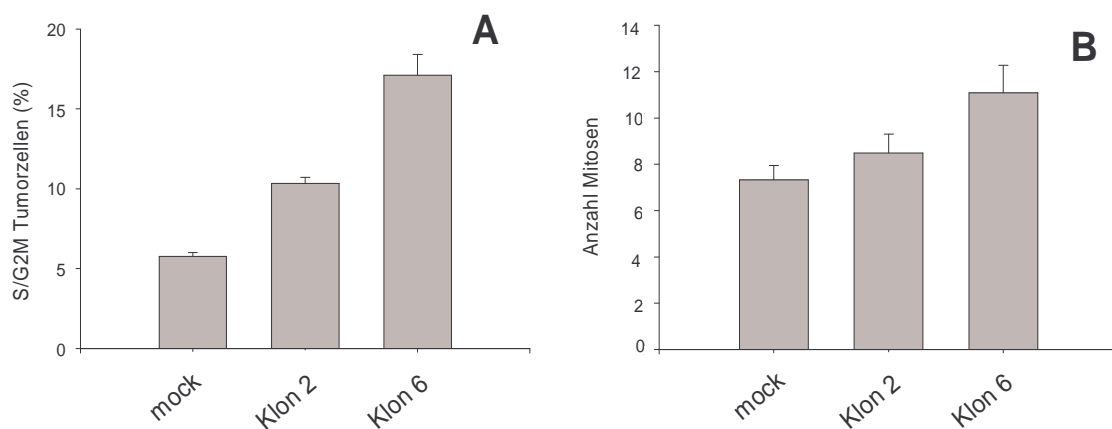


Abb.19: Proliferationsrate von MDA-MB 361 Brusttumorzellen in Xenografttumoren. A) Durchflußzytometrische Analyse des SG2M-Phaseanteil der Zellzyklusverteilung der Tumorzellpopulation; B) Mikroskopische Analyse der Mitosezahl pro Gesichtsfeld auf HE-gefärbten Gewebeschnitten.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die Wachstumsfraktion der Xenografttumore mit einer anderen Methode durch mikroskopische Bestimmung der Zahl mitotischer Zellen auf HE-gefärbten Gewebeschnitten ermittelt. Dazu wurden jeweils 25 Gewebeschnitte verschiedener Xenografttumore aus den 3 Gruppen hergestellt (siehe 3.2.5.1 und 3.2.5.4). Anschließend wurden die Objektträger randomisiert, d.h. eine dritte Person ordnete den Objektträgern zufällige Nummern von 1-75 und dokumentierte die zugehörigen Tiernummern. Insgesamt wurden 40 der 75 randomisierte Gewebeschnitte bei 400-facher Vergrößerung analysiert, wobei die Anzahl der Mitosen pro Gesichtsfeld jeweils in 3 zentralen Tumorbereichen sowie in 3 Randbereichen des Tumors bestimmt wurde. Dabei wurde jedes Gesichtsfeld von 2 Personen ausgezählt und die Zahl der Mitosen nach Auflösung der Randomisierung über alle peripheren und zentralen Bereiche eines Gewebeschnittes gemittelt. In Abb.19 B ist die durchschnittliche Zahl mitotischer Zellen aller untersuchter Gewebeschnitte von Gruppe 1 (n = 14), Gruppe 2 (n = 15) und Gruppe 3 (n = 11) Tumoren gezeigt. Auch mit dieser Methode konnte eine größere Wachstumsfraktion in Gruppe 3 Tumoren ermittelt werden. Die durchschnittliche Zahl der Mitosen pro Gesichtsfeld betrug in Gruppe 1 (mock) 7.3 und in Gruppe 2 (Claudin-1 Klon 2) 8.5, in Gruppe 3 (Claudin-1 Klon 6) jedoch 11.1 (p-Werte Gruppe 1-3 0.005, Gruppe 2-3 0.070 und Gruppe 1-2 0.264) Die Anzahl mitotischer Zellen in peripheren Tumorbereichen war unabhängig von der Gruppe etwas höher als in zentralen Tumorbereichen und betrug 8.0, 9.7 und 12.6 im Vergleich zu 6.7, 7.3 und 9.5 mitotischen Zellen pro Gesichtsfeld (jeweils Gruppe 1, 2 und 3).

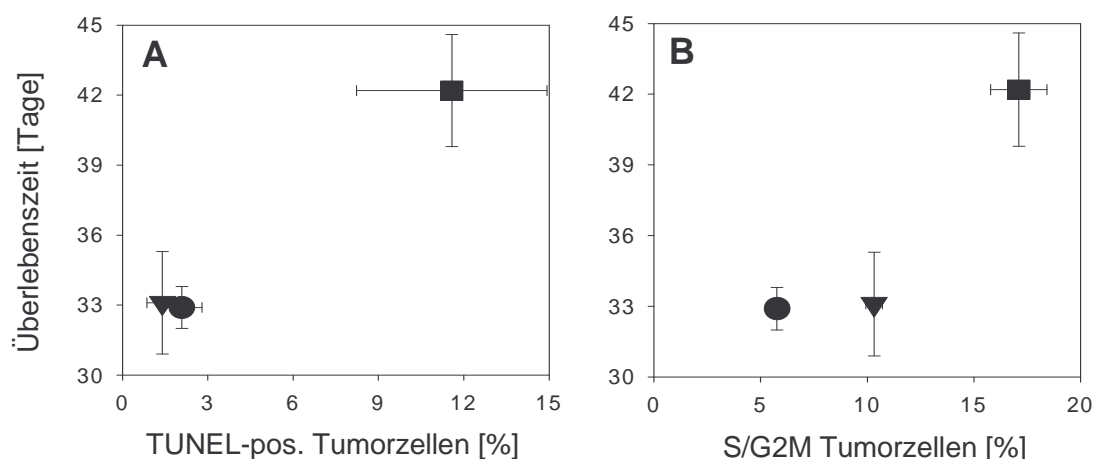


Abb.20: Korrelation von Überlebenszeit der Mäuse mit der apoptotischen und proliferierenden Tumorzellfraktion von MDA-MB 361 Zellen. A) Anteil apoptotischer TUNEL-positiver Zellen; B) S/G2M Phaseanteil der Zellzyklusverteilung der Tumorzellpopulation. Kreise: Mock (Claudin-1 negativ); Dreiecke: Klon 2 (Claudin-1 zytoplasmatisch); Quadrate: Klon 6 (Claudin-1 membranständig).

Die Korrelationsplots in Abb.20 fassen das Ergebnis der Bestimmung der Überlebensrate und der durchflußzytometrischen Untersuchungen von Apoptoseinduktion und Zellproliferation noch einmal zusammenfassen. Es ist ersichtlich, daß die deutlich längere mittlere Überlebenszeit der Gruppe 3 Mäuse von etwa 9 Tagen (siehe 4.2.2.1) mit einer 4.6- bzw. 6.3-fach höheren Zahl apoptotischer Tumorzellen in den Xenografttumoren im Vergleich zu Gruppe 1 und 2 Mäusen korreliert (siehe 4.2.2.4). Trotz verlängerter Lebenszeit und höherer Absterberate der Tumorzellen in Gruppe 3 Tieren wurde jedoch gleichzeitig ein 2.9- und 1.7-fach höherer Anteil proliferierender Tumorzellen in den Xenografttumoren im Vergleich zu Gruppe 1 und 2 Tieren ermittelt.

4.2.2.6 Stromaanteil und Gefäßversorgung der Xenografttumore

Um zu untersuchen, ob das verringerte Tumorwachstum auf eine verminderte Blutgefäßversorgung von Gruppe 3 Tumoren mit membranständiger Expression von Claudin-1 zurückzuführen war, wurde die Vaskularisierung von Xenografttumoren aller 3 Versuchsgruppen analysiert. Wie in 4.2.2.1 beschrieben stellt der relative Mausstromaanteil der Tumormasse, welcher sich hauptsächlich aus eingewanderten murinen Endothel-, Blut/Immun- und Bindegewebszellen zusammensetzt, ein relatives Maß für die Gefäßversorgung des Tumors dar.

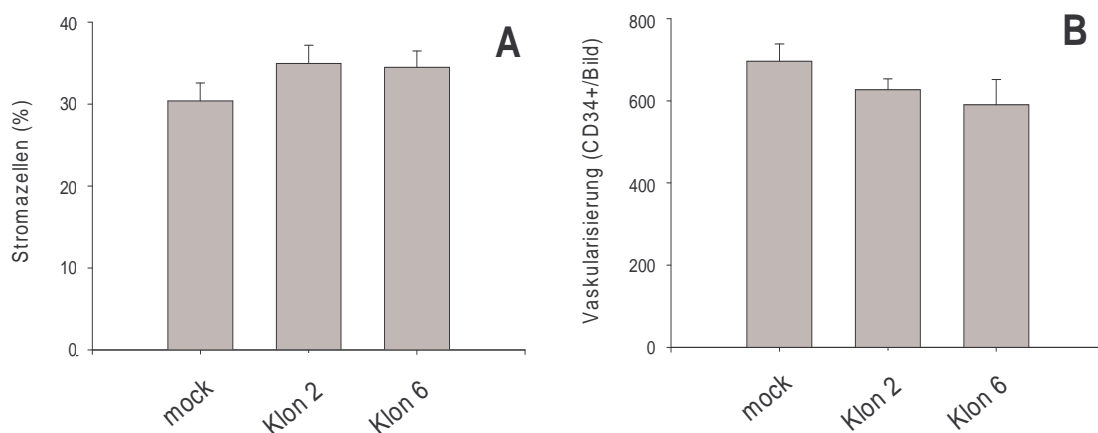


Abb.21: Stromaanteil und Vaskularisierung in MDA-MB 361 Xenografttumoren. A) Durchfluß-zytometrische Analyse des Mausstromaanteils. B) Immunhistochemische Analyse und morphometrische Auswertung CD34-positiver Mausendothelzellen auf Gewebeschnitten.

Aus Abb.21 A wird ersichtlich, daß sich der prozentuale Stromaanteil der gesamten Tumorzellpopulation nur sehr geringfügig voneinander unterschieden. Er betrug durchschnittlich 30.3 % in Gruppe 1, 35.1 % in Gruppe 2 und 34.5 % in Gruppe 3 Tumoren, wobei diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren (p-Werte Gruppe 1-3 0.178, Gruppe 2-3 0.881, Gruppe 1-2 0.155).

Um ein direktes Maß für die Gefäßversorgung der Tumore zu haben, wurde eine immunhistochemische Markierung von Gefäßstrukturen auf Gewebeschnitten unter Verwendung eines Anti-Maus CD34-Antikörpers durchgeführt, der spezifisch an ein extrazelluläres CD34 Epitop auf Endothelzellen kleiner Blutgefäße und sich neuformierender Kapillaren bindet.

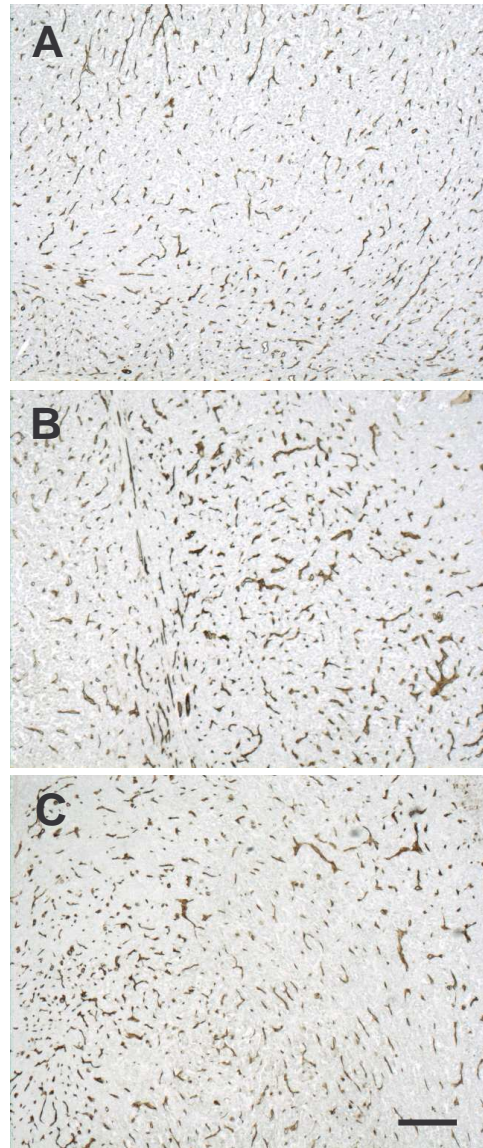


Abb.22: Immunhistochemische Färbung von CD34-positiven Mausendothelzellen auf Tumorgewebeschnitten. A) MDA-MB 361 mock-Kontrolle (Claudin-1 negativ); B) MDA-MB 361 Klon 2 (Claudin-1 positiv, zytoplasmatisch lokalisiert); C) MDA-MB 361 Klon 6 (Claudin-1 positiv, membranlokalisiert). Balken: 200 μ m

Insgesamt wurden pro Gruppe je 10 Paraffinschnitte unterschiedlicher Xenografttumore mit dem unter 3.2.5.3 beschriebenen immunhistologischen Protokoll gefärbt und von jedem Gewebeschnitt 6 zufällige Areale bei 100facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert (siehe Abb.22). Unter Verwendung eines Bildverarbeitungsprogramm wurde durch Objektklassi-

fizierung die Anzahl der im Bildausschnitt gelegenen Gefäße bestimmt. Wie in Abb.21 B gezeigt ist, lieferte die morphometrische Betrachtung der Gefäßdichte ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede bei einem Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen, die statistisch nicht signifikant waren. Im Mittel wurden pro untersuchtem Bildabschnitt 696 Gefäße in Gruppe 1, 627 Gefäße in Gruppe 2 und 593 Gefäße in Gruppe 3 Tumoren gefunden (p-Werte Gruppe 1-3 0.173, Gruppe 2-3 0.594, Gruppe 1-2 0.180).

4.3 Untersuchung epigenetischer Regulationsmechanismen der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen

4.3.1 Ras-Signaltransduktionsweg

Die konstitutive Aktivierung des Ras-Signaltransduktionswegs führt zu erhöhter Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie zur Unterdrückung apoptotischer Signalwege in Tumorzellen und spielt damit eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Karzinomen (135). Mehrere Untersuchungen in verschiedenen nicht-humanen Zellmodellen deuteten daraufhin, daß der Ras-MEK-ERK Signalweg möglicherweise an der Regulation von Expression und Lokalisation TJ assoziierter Proteine sowie dem Verlust der Tight Junction Funktion beteiligt ist (127, 132, 134). Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Aktivität des Ras-Signaltransduktionswegs die Expression und Lokalisation von Claudin-1 sowie die Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen beeinflusst, wurde der Effekt der Inhibition von MEK-1 in MCF-7 Zellen mit sehr geringer endogener Expression von Claudin-1 und in T47-D Zellen mit hoher endogener Expression von Claudin-1 (siehe 4.1.1) analysiert.

4.3.1.1 Expression von Ras in T47-D und MCF-7 Brusttumorzellen

Studien über den Aktivierungszustand von Ras in verschiedenen Brusttumorzelllinien durch Bestimmung des zellulären Ras-GTP Gehalts hatten gezeigt, daß T47-D Zellen eine niedrige Ras-Aktivität aufweisen, während sich MCF-7 Zellen durch eine erhöhte Aktivität von Ras im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen auszeichnen (176). In Abb.23 ist eine quantitative Western Blot-Analyse der Ras-Proteinexpression in T47-D und MCF-7 Brusttumorzellen gezeigt. In beiden Zelllinien konnten signifikante Mengen von Ras-Protein nachgewiesen werden. Desweiteren ist ersichtlich, daß die Expression von Ras Protein in MCF-7 Zellen deutlich höher war im Vergleich zu konfluenten T47-D Zellkulturen. Eine quantitative Untersuchung der

Protein-bandenintensitäten ergab eine 2.4 fach höhere Ras-Proteinmenge in MCF-7 verglichen mit T47-D Zellen.

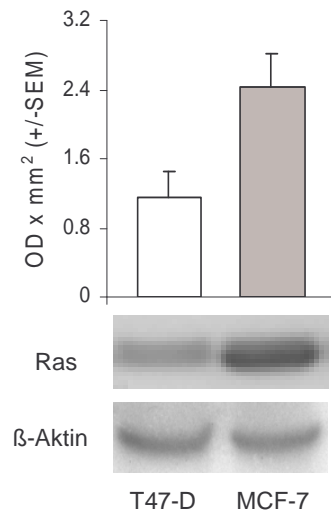


Abb.23: Proteinexpression von Ras in konfluenten T47-D und MCF-7 Zellkulturen. Das relative Expressionsniveau von Ras wurde durch densitometrische Analyse der Western Blot Banden quantifiziert. Der parallele Nachweis von β -Aktin diente als interne Ladekontrolle gleicher Proteinnengen.

4.3.1.2 MEK-1 Inhibition und Expression von Tight Junction assoziierten Proteinen

Um die Ras-abhängige Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu blockieren, wurden parentale T47-D und MCF-7 Zellen mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 behandelt, der eine selektive Hemmung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 hervorruft und damit zur Inaktivierung des Ras-MEK-ERK Signalweges unterhalb von MEK-1 führt. Durch Zellzyklusanalysen konnte in einem Vorversuch ermittelt werden, daß eine Exposition mit bis zu 50 μ M PD98059 für 24 h in beiden Zelllinien keine signifikante Toxizität (SubG1 Peak Analyse) oder Inhibition der Zellproliferation bewirkt, welche möglicherweise eine unspezifische Änderung der Expression oder der zellulären Lokalisation von Claudin-1 verursachen könnte. In Abhängigkeit der Konzentration von PD98059 blieb die SG2M Phase Zellfraktion in MCF-7 Zellen nahezu konstant (Kontrolle: 34.7 % im Vergleich zu 33.7, 31.9 und 33.1 % bei 10, 30 und 50 μ M), während es in T47-D Zellen zu einer leichten Abnahme der Wachstumsfraktion kam (Kontrolle: 26.7 % im Vergleich zu 18.1, 20.0 und 17.5 % bei 10, 30 und 50 μ M). Eine Zunahme des Zelltodes wurde in keiner der beiden Zelllinien bei allen getesteten Konzentrationen gefunden. Der Effekt des MEK-Inhibitors PD98059 auf die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 wurde in beiden Zelllinien bei nicht-toxischen Konzentrationen von 10 bis 50 μ M untersucht. Wie aus Abb.24 A ersichtlich, ergaben sich sowohl in T47-D als auch MCF-7 Zellen keine Änderungen der Gesamtproteinmenge von ERK1/2 bei PD98059 Konzentrationen bis 50 μ M. Allerdings führten Konzentrationen von 10

μM in MCF-7 und T47-D Zellen zu einer massiven Abnahme der phosphorylierten Form von ERK1/2. Trotz vollständiger Inhibition der ERK1/2 Phosphorylierung zeigten sich jedoch bei effektiven PD98059 Konzentrationen keine signifikanten Änderungen der Proteinexpression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 in beiden Zelllinien (Abb.24 B). Auch parentale MCF-7 Zellen, die in unbehandelter Zellkultur lediglich sehr geringe endogene Mengen von Claudin-1 exprimierten (siehe Abb.1), zeigten nach MEK-1 Inhibition keine Reexpression größerer Mengen von Claudin-1 Protein.

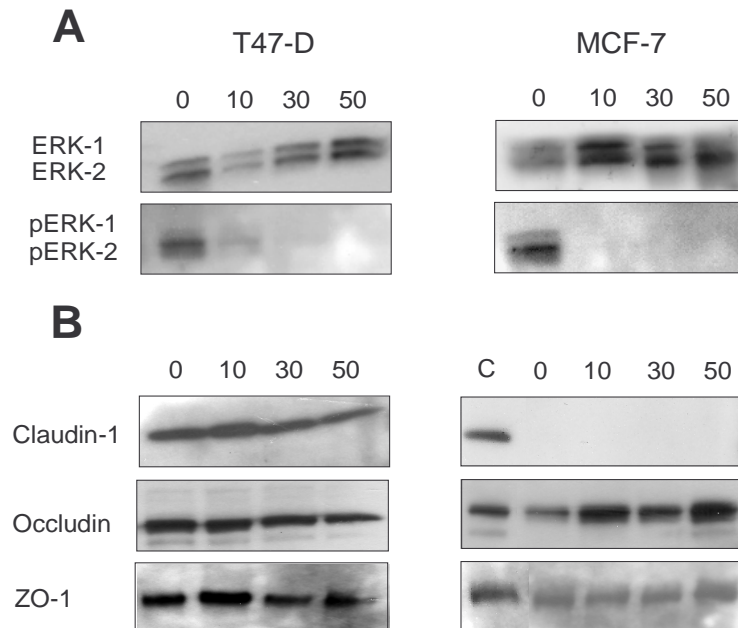


Abb.24: Änderung des Phosphorylierungs- und Expressionsstatus von ERK1/2 (A) sowie der Expression der Tight Junction assoziierten Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 (B) in parentalen T47-D und MCF-7 Brusttumorzelllinien nach MEK-1Inhibition. Die Zellen wurden für 24 h mit 0 μM (Kontrolle), 10, 30 und 50 μM des MEK-1 Inhibitors PD98059 behandelt. T47-D Zellysat diente als Positivkontrolle (C) für die Analyse der endogenen Claudin-1 Expression in MCF-7 Zellen.

Um die Nachweisgrenzen zu erhöhen wurden Untersuchungen zur mRNA Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 durchgeführt. Tabelle 1 zeigt das relative mRNA Expressionsniveau der untersuchten Proteine in T47-D und MCF-7 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μM PD98059. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Genexpression dieser drei Tight Junction assoziierten Proteine detektiert werden. Zusammenfassend mußte also festgestellt werden, daß weder eine trans-kriptionelle noch eine posttranskriptionelle Regulation von Claudin-1, Occludin und ZO-1 in Abhängigkeit der ERK1/ERK2 Aktivität in beiden untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

	T47-D	MCF-7
	[Mittelwert +/- SEM]	[Mittelwert +/- SEM]
GAPDH	1.21 +/- 0.09	1.20 +/- 0.11
Claudin-1	0.88 +/- 0.11	1.14 +/- 0.23
Occludin	1.40 +/- 0.15	1.48 +/- 0.23
ZO-1	0.90 +/- 0.09	1.01 +/- 0.23

Tabelle 1: Relative Expression von Claudin-1, Occludin and ZO-1 mRNA in T47-D and parentalen MCF-7 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μ M PD98059 (unbehandelte Kontrollzellkultur: 1.0). Die Daten stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

4.3.1.3 Inhibition der MEK-1 Aktivität und Lokalisation von Claudin-1

Chen et al. hatten beschrieben, daß Ras-transformierte MDCK II Hundezellen eine unphysiologische Lokalisation von Claudin-1 im Zytoplasma aufwiesen, die nach MEK-1 Inhibition durch PD98059 primär Membranlokalisation zeigten. Um den Effekt unterschiedlicher Ras-Aktivität auf das zelluläre Homing von Claudin-1 in Brusttumorzellen zu untersuchen, wurde Claudin-1 durch retrovirale Transduktion in MCF-7 Zellen artifiziell überexprimiert, wobei sowohl eine membranständige als auch eine signifikante zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-1 erkennbar war. Parentale Zwei dieser Claudin-1 positiven MCF-7 Tochterzellklonpopulationen und T47-D Zellen wurden mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 behandelt.

Abb.25 zeigt die Zeitkinetik der Wirkung von 50 μ M PD98059 auf die Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 Protein. Sowohl in T47-D als auch in den beiden Claudin-1 positiven MCF-7 Zellklonen K10 und K30 wurde die Phosphorylierung von ERK1/ERK2 nach Inkubationszeiten von 1 h bis 24 h mit 50 μ M PD98059 deutlich inhibiert, während sich die Expression von ERK1/2 nicht änderte. Parallel konnten auch keine Änderungen der Gesamtproteinmenge von Claudin-1, Occludin und ZO-1 in beiden Zelllinien festgestellt werden. Abb.26 zeigt das Ergebnis der subzellulären Verteilung von Claudin-1 Protein vor und nach MEK-1 Inhibition für 1 h bzw. 24 h in endogen Claudin-1 positiven T47-D und den beiden Claudin-1 transduzierten Zellklonen K10 und K30. In beiden Zelllinien konnten auch keine auffälligen Änderungen der Zellmorphologie nach Behandlung mit PD98059 beobachtet werden, die für eine Umordnung der zellulären Zytoskelettstruktur sprechen würden. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, weisen T47-D mit niedriger Ras-Aktivität ein Zell-Zellkontakt spezifisches Lokalisationsmuster von Claudin-1 mit schwacher intrazellulärer Färbung auf, die sich auch nach 1 h bzw. 24 h Behandlung mit 50

μM PD98059 nicht sichtbar änderte. Trotz höherer Ras-Expression und -Aktivität wiesen die beiden analysierten MCF-7 Tochterzellklone K10 und K30 nach artifizieller Überexpression von Claudin-1 eine Membranlokalisation des Proteins auf, wenngleich in geringerem Ausmaß im Vergleich zur endogenen Claudin-1 Expression in T47-D Zellen. Abweichend vom Claudin-1 Lokalisationsmuster in T47-D Zellen konnte in beiden Zellklonen auch eine signifikante intrazelluläre Färbung punktförmiger Aggregate festgestellt werden, die in MCF-7 K30 Zellen ausgeprägter vorhanden war bei gleichzeitig geringerem Ausmaß membranlokalisierter Expression von Claudin-1 im Vergleich zu K10 Zellen. Es konnten jedoch sowohl nach 1 h als auch 24 h Inhibition von MEK-1 mit 50 μM PD98059 in beiden Zellklonen keine Änderungen der subzellulären zytoplasmatischen bzw. membranständigen Lokalisation von Claudin-1 festgestellt werden (Abb.26). Dies deutete darauf hin, daß das zelluläre Homing von Claudin-1 Protein durch die Inhibition des MAPK Signalwegs nicht beeinflusst wurde.

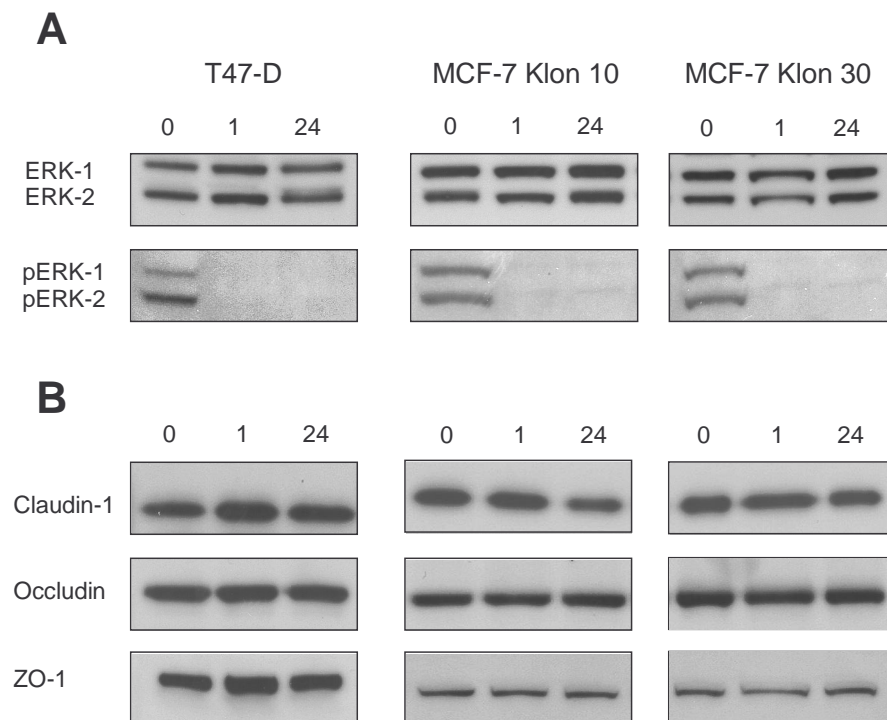


Abb.25: Zeitkinetik der Expression und Phosphorylierung von ERK-1/2 (A) sowie der Expression von Tight Junction assoziierten Proteinen (B) in parentalen T47-D und Claudin-1 transduzierten MCF-7 Tochterzellklonen K10 und K30 nach Inhibition von MEK-1 für 0 h (Kontrolle), 1 h und 24 h.

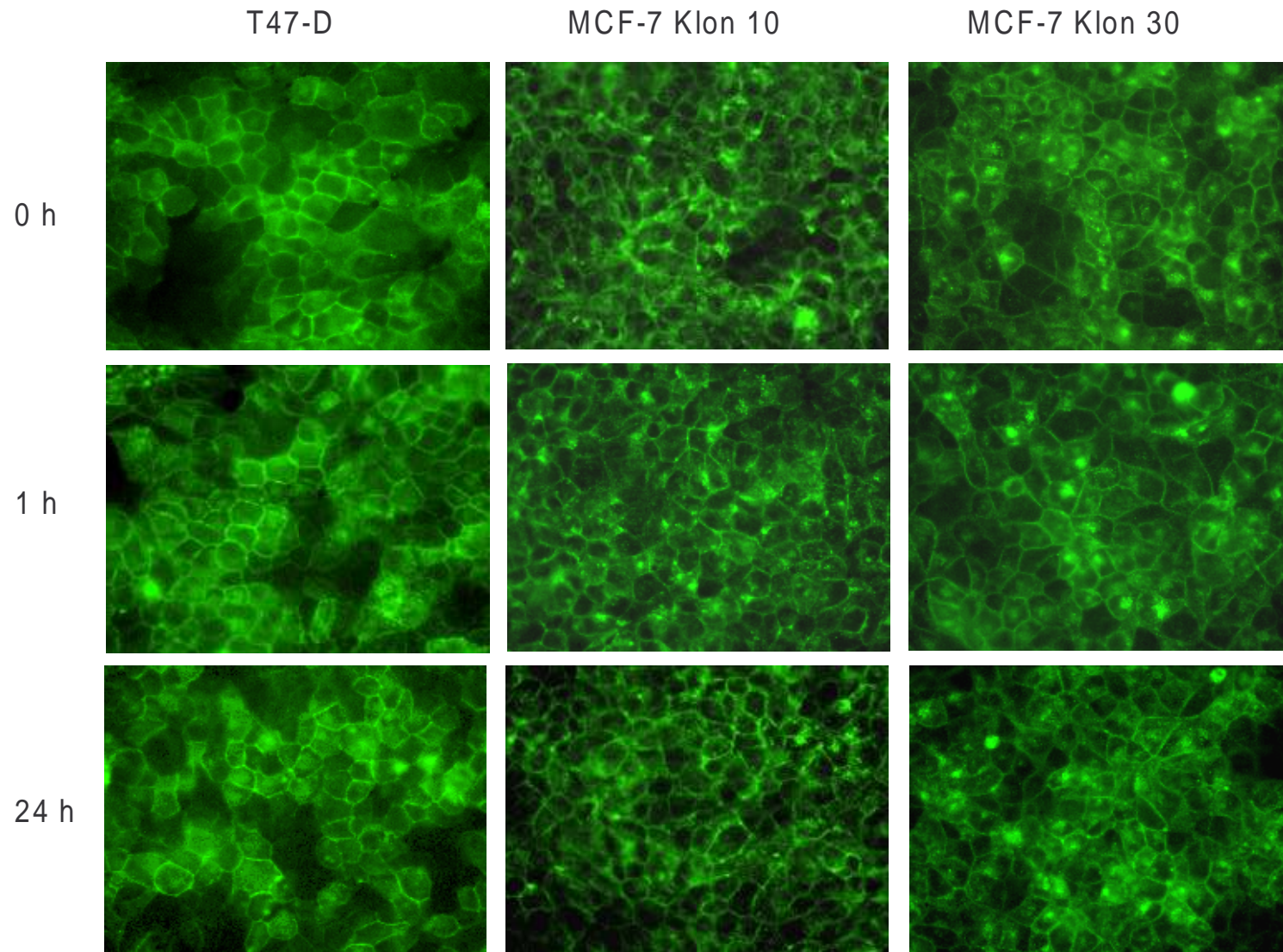


Abb.26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von Claudin-1 Protein in T47-D und Claudin-1 transduzierten MCF-7 Zellklonen K10 und K30. Vor Behandlung (0 h Kontrolle) und nach 1 h bzw. 24 h Inkubation mit 50 μ M PD98059. Vergrößerung 400x.

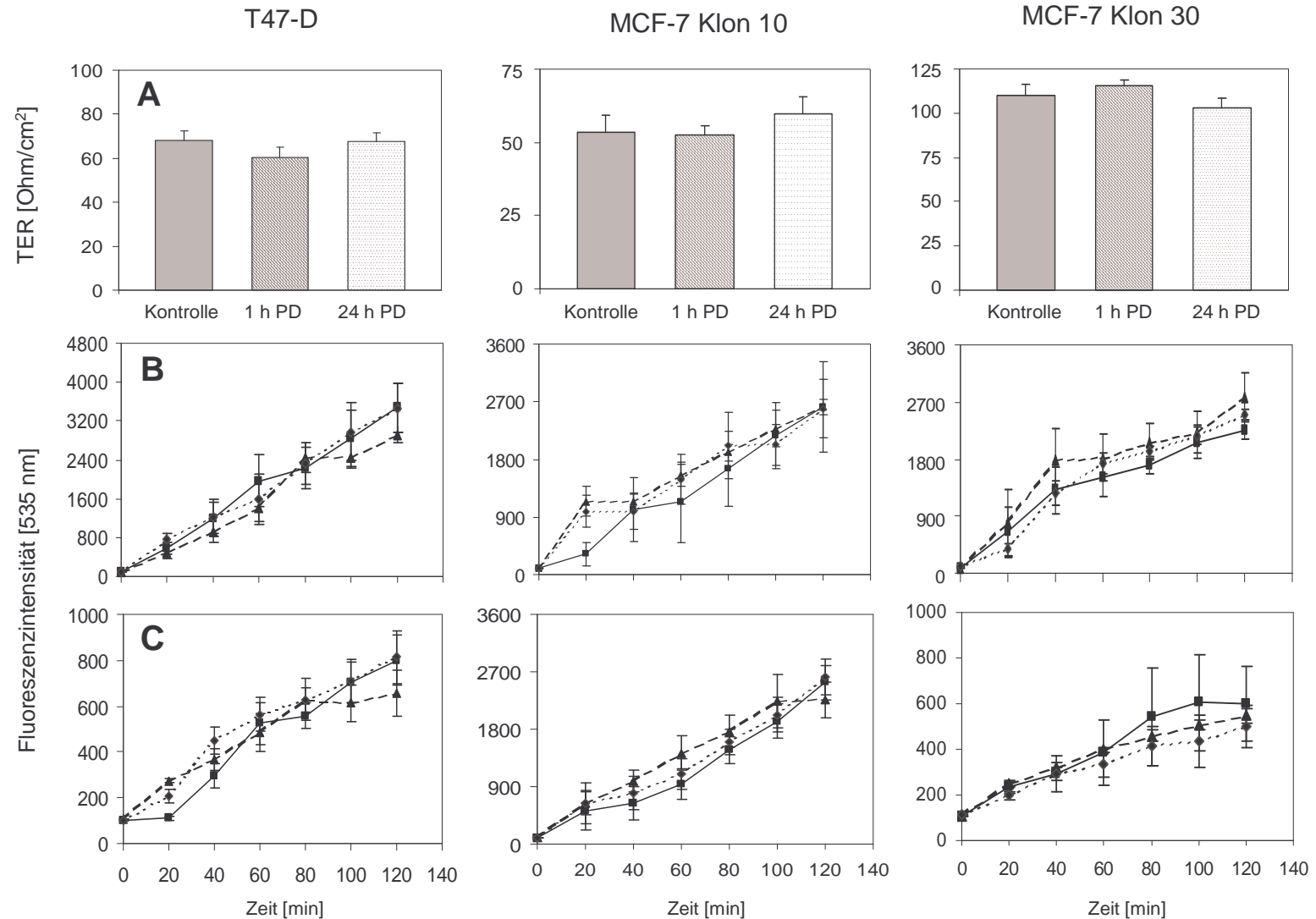


Abb.27: Untersuchung der Tight Junction Diffusionsbarriere in T47-D Zellen und Claudin-1 positiven MCF-7 Zellklonen K10 und K30. Konfluente Zellmonolayer in Transwells wurden für 0 h (Kontrolle), 1 h und 24 h mit 50 μ M PD98059 inkubiert. Die parazelluläre Ionendurchlässigkeit wurde durch Messung der transepithelialen elektrischen Resistenz (TER) bestimmt (A). Der parazelluläre Molekülflux wurde durch Messung einer Diffusionskinetik bis 120 min von 3 kD (B) und 40 kD (C) FITC-Dextran über Zellmonolayer untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht Mittelwerten (\pm SEM) aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils Dreifachbestimmungen. B und C: jeweils Kontrollkultur gestrichelte Linie; 1 h PD98059 durchgezogene Linie; 24 h PD98059 gepunktete Linie.

4.3.1.4 Tight Junction Diffusionsbarriere in Brusttumorzellen nach MEK-1 Inhibition

Um auszuschließen, daß nach MEK-1 Inhibition submikroskopische Veränderungen der Lokalisation von Tight Junction Proteinen auftraten, die möglicherweise mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden konnten, wurden funktionelle Untersuchungen der Tight Junction Barriere Funktion für geladene und ungeladene Moleküle in beiden Zelllinien durchgeführt. Abb.27 zeigt die Untersuchung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) sowie der parazellulären Diffusion von 3 und 40 kD FITC-Dextranmolekülen nach 1 h und 24 h Inhibition von MEK-1 mit 50 μ M PD98059. Sowohl in T47-D als auch in Claudin-1 positiven MCF-7 Zellklonen K10 und K30 konnten keine Änderungen der Diffusionsrate von Ionen bzw. von 3 kD und 40 kD Dextranmolekülen nach MEK-1 Inhibition festgestellt werden. Dies weist darauf hin, daß weder submikroskopische noch physiologisch relevante Änderungen Tight Junction assoziierter Proteine nach Blockierung des Ras-MEK-ERK Signalwegs stattfanden.

4.3.2 Promotormethylierung des Claudin-1 Gens

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben fand sich mit Ausnahme der T47-D Zelllinie in allen untersuchten Brusttumorzelllinien eine stark verringerte bzw. ein kompletter Verlust der Claudin-1 Expression im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen. Untersuchungen der Gensequenz von Claudin-1 in 189 Brusttumorpatientinnen sowie zehn verschiedenen Brusttumorzelllinien hatten gezeigt, daß sowohl im 5' und 3' untranslatierten Bereich als auch in den kodierenden Sequenzen des Claudin-1 Gens keine relevanten Mutationen in Tumor- verglichen mit Normalzellen zu finden waren, die auf eine genetisch bedingte Downregulierung von Claudin-1 in der Brusttumorgenese hindeuten (167). Eine häufiger epigenetischer „gene silencing“ Mechanismus in Tumorzellen stellt jedoch die durch Methyltransferasen katalysierte Methylierung von Cytosin-Resten in Promotorregionen betroffener Gene dar. Die Sequenzanalyse des Claudin-1 Promotorbereichs sowie des ersten Claudin-1 Exons ergab einige CG-Sequenzabfolgen vor dem Transkriptionsstart zwischen -400 und -500, die allgemein als CpG Insel bezeichnet werden und besonders häufig von einer Cytosin- Methylierung betroffen sind. Um eine Promotormethylierung des Claudin-1 Gens für den Verlust der Claudin-1 Genexpression auszuschließen, wurden die Claudin-1 negativen MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Brusttumorzelllinien mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin behandelt und anschließend die Claudin-1 mRNA sowie die Proteinexpression untersucht. Die Zeitkinetik der Toxizität von 5-Azacytidin ergab, daß eine 72-stündige Inkubation mit Konzentrationen bis zu 1 μ M die Vitalität von Brusttumorzellen nicht signifikant beeinträchtigte, während bei höheren Konzentrationen bereits nach 24 h Behandlung

eine Zunahme des Zelltods bei gleichzeitiger Inhibition der Zellproliferation zu beobachten war. Deshalb wurde die Expression von Claudin-1 nach Inkubationsdauer von bis zu 1 Woche mit 1 μM 5-Azacytidin als auch nach kurzer Behandlungsdauer von 24 h mit bis zu 100 μM 5-Azacytidin untersucht.

In Abb.28 ist exemplarisch der Nachweis von Claudin-1 mRNA mittels Real-time RT-PCR nach Behandlung von Claudin-1 negativen MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen mit 1 μM 5-Azacytidin für 48 h gezeigt. Aus den RT-PCR Kurven ist ersichtlich, daß T47-D Zellen als Positivkontrolle hohe Mengen an Claudin-1 mRNA exprimierten, während sich in 5-Azacytidin-behandelten MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen keine signifikante Zunahme der Claudin-1 mRNA gegenüber dem Kontrollansatz ohne zelluläre RNA zeigte. Ähnliche Ergebnisse wurden nach längerer 5-Azacytidin Inkubationszeit oder höheren Substanzkonzentrationen erhalten. Zusammenfassend ließ sich festhalten, daß unter keiner der untersuchten Bedingungen eine Aufregulierung der Claudin-1 Expression nach 5-Azacytidin Behandlung detektiert werden konnte.

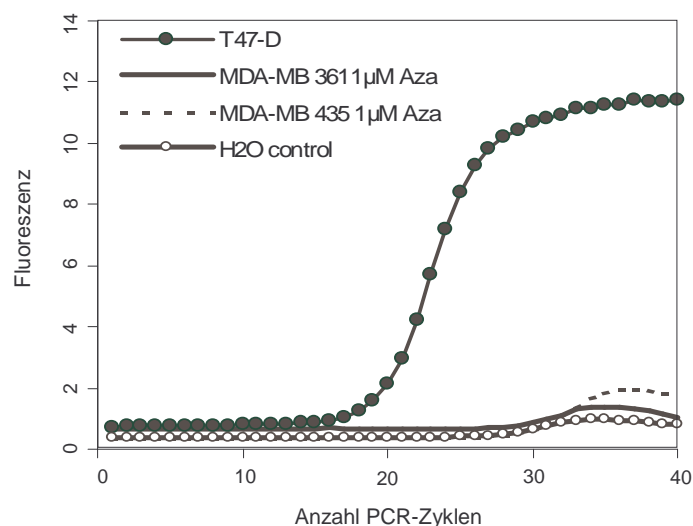


Abb. 28: RT-PCR Kurven der Claudin-1 mRNA Expression in T47-D Zellen und nach Behandlung von parentalen MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen mit 1 μM 5-Azacytidin nach 48 h.

4.3.3 Bedeutung nukleärer Retinoid-Rezeptor Signalwege

Nukleäre Retinoid-Rezeptoren stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die durch Aktivierung mit Retinoid-Liganden an palindromische DNA Sequenzmotive (RARE, retinoic acid responsive elements) binden und dadurch die Transkription von Genen beeinflussen, die an der Steuerung von Zellproliferation und –Differenzierung in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen beteiligt sind. Zwei unabhängige Publikationen deuteten darauf hin, daß sowohl die Expression von Tight Junction assoziierten Proteinen als auch die transepitheliale Diffusionsbarriere durch

Stimulation von Retinoidrezeptoren mit all-trans Retinsäure in unterschiedlichen Zellmodellen reguliert sein könnte (119, 129). Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung bekannter Literaturdaten über den Expressionsstatus von α -, β - und γ -Retinsäure-Rezeptor (RAR) bzw. α - und β -Retinoid-X-Rezeptor (RXR) Unterformen in unterschiedlich differenzierten Brusttumorzelllinien (172).

Zelllinie	RAR- α	RAR- β	RAR- γ	RXR- α	RXR- β
MCF-7	+ ^{177,178,179}	- ^{177,178} , + ¹⁸¹	+ ^{178,179}	+ ¹⁸²	+ ¹⁸²
T47-D	+ ^{177,178,179}	- ^{178,180} , + ¹⁷⁷	+ ^{178,179,180}	+ ^{180,182}	+ ¹⁸²
MDA-MB-231	- ¹⁷⁷ , + ^{178,179}	+ ^{179,181} , - ^{177,178}	+ ^{178,179,180}	+ ¹⁸³	nd
SK-BR-3	- ¹⁸⁰ , + ¹⁷⁸	+ ¹⁷⁸ , - ¹⁸⁰	+ ^{178,180}	+ ¹⁸⁰	nd
MDA-MB-435	- ¹⁷⁸	+ ^{178,180,181}	+ ^{178,180}	nd	nd
MDA-MB-361	+ ¹⁷⁹	- ⁸	+ ¹⁷⁹	nd	nd

Tabelle 2: Publierte Expressionsdaten von RAR und RXR Rezeptoren in Brustumorzelllinien (Nummern beziehen sich auf Literaturstellenzitate). Für MCF7-ADR und MDA-MB 231-BAG Zellen sowie für den Expressionsstatus einiger RXR- α and RXR- β Rezeptoren liegen bisher keine Literaturdaten (nd) vor.

Es ist ersichtlich, daß die meisten in Brusttumorzellen untersuchten Subtypen von Retinoid-Rezeptoren nachweisbar exprimiert sind, weshalb der Expressionsverlust von Retinoid-Rezeptoren für die Downregulierung der Claudin-1 Expression wahrscheinlich keine Rolle spielte. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß der Expressionsverlust von Claudin-1 in Brusttumorzellen durch eine fehlende oder geringe Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren mit Retinoidliganden verursacht war. Um dies zu analysieren, wurden Brusttumorzellen mit verschiedenen Retinoidsubstanzen bekannter Wirksamkeit behandelt. Tabelle 3 zeigt die Selektivität sowie die EC₅₀-Werte (50 % der maximalen CAT-Aktivität) der verwendeten Substanzen, die mit Hilfe eines zellulären Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Assays bestimmt wurden (184). Die antagonistischen bzw. selektiv agonistischen Wirkungen der Retinoide auf die Retinoid-Rezeptoraktivität wurde in einem Konzentrationsbereich von 3-150 nM gemessen. Toxizitätsanalysen auf 8 Brustumorzelllinien ergaben zudem, daß die untersuchten Retinoidsubstanzen über einen Zeitraum von 72 h bis zu Konzentrationen von 1 μ M eingesetzt werden konnten ohne daß dies zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Zellvitalität führte.

Nummer/Substanz		Selektivität	EC ₅₀ [nM]
1	all-trans RA	RAR-Panagonist	4.0
2	13-cis RA	RAR-Panagonist	9.2
3	Arotinoid	RAR-Panagonist	3.0
4	9-cis RA	RAR/RXR-Panagonist	15.0
5		RAR- α Agonist	3.0
6		RAR- α Antagonist	*
7		RAR- β Agonist	39.0
8		RAR- γ Agonist	15.0
9		RAR- γ Agonist	150.0
10	Targretin	RXR- α/γ Agonist	39.0
11		RXR- α/γ Antagonist	*

Tabelle 3: Selektivität und EC₅₀-Werte der für die Behandlung von Brusttumorzelllinien verwendeten Retinoid-Substanzen. Die EC₅₀-Werte wurden in einem CAT-Assay bestimmt. Die Sternchen markieren RAR-RXR Antagonisten (keine Zunahme der CAT-Aktivität).

Als Studienmodelle für die Analyse der Retinoidsstoffwirkung wurden acht verschiedene Brusttumorzelllinien verwendet, denen von Sommers et al. (172) aufgrund zellmorphologischer Kriterien sowie der Expression verschiedener epithelialer Markerproteine ein bestimmter Differenzierungsstatus zugeordnet wurde. Als hochdifferenziert wurden die T47-D, MCF-7 und MDA-MB 361 Zelllinie eingestuft (E-Cadherin positiv), während SK-BR 3, MDA-MB 435, MDA-MB 231 und MCF-7 ADR Zellen (E-Cadherin negativ) als niedrigdifferenziert eingeordnet wurden. Zusätzlich wurde ein von MDA-MB 231 Zellen abgeleiteter hochinvasiver Klon, die MDA-MB 231 BAG Zelllinie, in die Gruppe untersuchter Brusttumorzelllinien aufgenommen (169). Die Brusttumorzellen wurden für 24 h mit einer Substanzkonzentration von je 300 nM behandelt und die relative Expression von Claudin-1 mRNA durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. In Abb.29 sind exemplarisch die Ergebnisse dieser Untersuchung in zwei hochdifferenzierten (MCF-7 und T47-D) und zwei niedrigdifferenzierten Zelllinien (SK-BR 3 und MDA-MB 231) gezeigt.

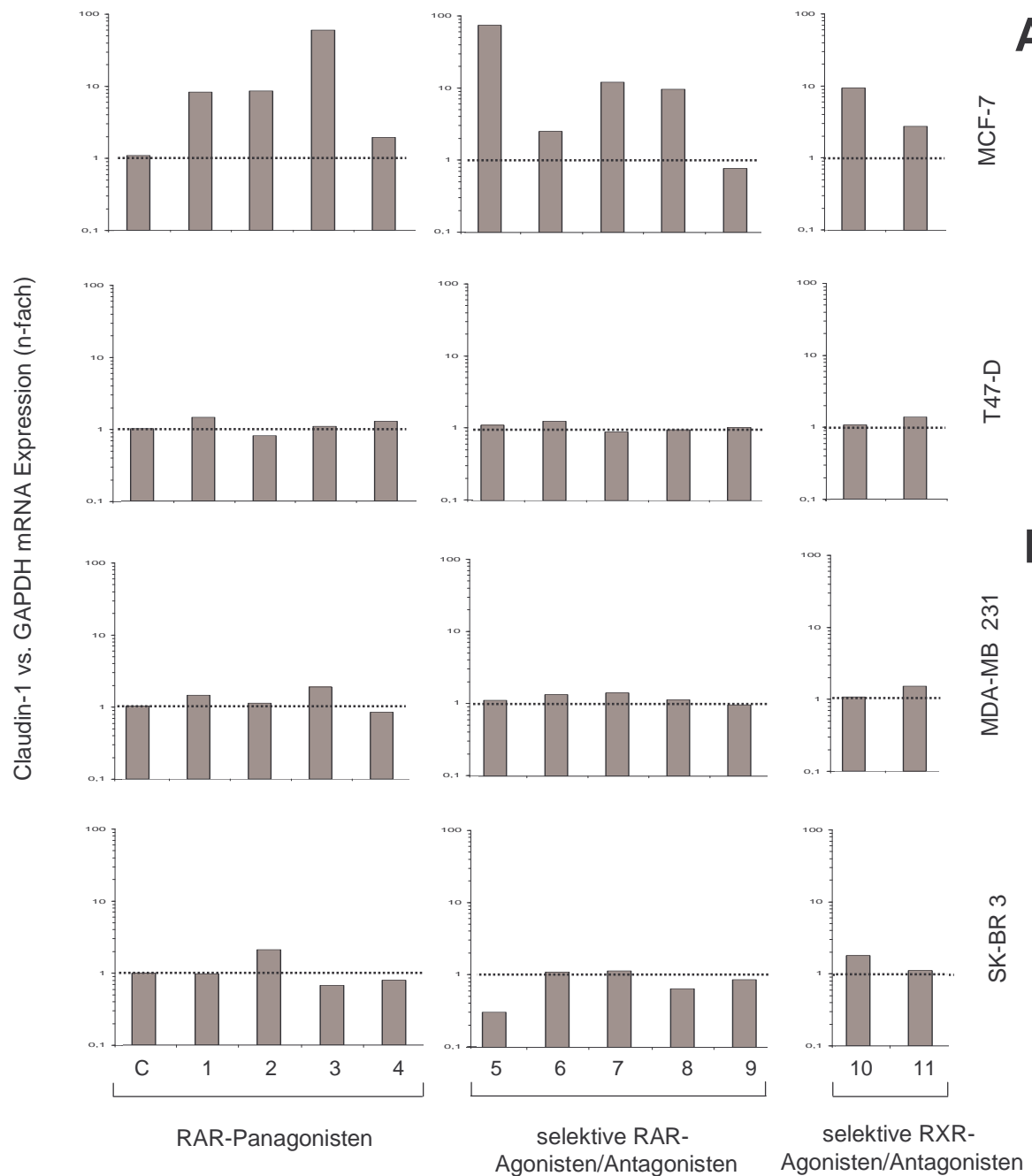


Abb.29: Relative Claudin-1 mRNA Expression in hochdifferenzierten MCF-7 und T47-D Brusttumorzellen und niedrigdifferenzierten MDA-MB 231 und SK-BR 3 Brusttumorzellen in konfluenter Zellkultur nach Behandlung mit Retinoiden (300 nM). Die Claudin-1 mRNA Expression wurde auf die Expression von GAPDH mRNA normalisiert und das Verhältnis der Expression beider Gene für die unbehandelte Kontrolle (C) als 1.0 gesetzt. Die Zahlen unter den Balken beziehen sich auf die in Tabelle 2 aufgeführten Retinoidsubstanzen. Jeder Messwert wurde in Doppelbestimmungen ermittelt und repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

In MCF-7 Zellen konnte nach Retinoidbehandlung eine Erhöhung der Claudin-1 mRNA detektiert werden. Unter den RAR-Panagonisten hatte all-trans Retinsäure (No.1) mit einer 7-fachen Zunahme der Claudin-1 mRNA Menge den schwächsten aufregulierenden Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (C), während Arotinoid (No.3) mit einem 47.6-fachen

Claudin-1 mRNA Zuwachs die größte Wirkung zeigte. Unter den selektiven RAR-Agonisten stimulierten vor allem RAR α - (No.5) und RAR β - (No.7) Agonisten die Claudin-1 Expression mit einer 58.8-fachen bzw. 10.3-fachen Erhöhung der Claudin-1 mRNA Menge. Hingegen zeigten RAR- und RXR-Antagonisten kaum eine Wirkung auf die Claudin-1 mRNA Expression (relative Expression im Vergleich zur Kontrolle: 0.7 bzw. 2.4). Damit nahm die Claudin-1 mRNA Menge in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit den wirksamsten Retinoiden RAR-Panagonist Arotinoid (No.3) und RAR α -Agonist (No.5) von ca. 0.2 % auf etwa 8-11 % im Vergleich zum Expressionsniveau von Claudin-1 mRNA in T47-D bzw. HMEC Zellen zu.

In den anderen untersuchten Zellmodellen T47-D, MDA-MB 231, SK-BR 3 und MCF-ADR konnte unabhängig vom Differenzierungsstatus keine Änderungen der Claudin-1 mRNA Menge nach Inkubation mit Retinoiden detektiert werden. Auch MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellen, in denen vor Retinoidbehandlung weder Claudin-1 mRNA noch Protein nachgewiesen werden konnte (siehe 4.1.1), zeigten nach Stimulation mit Retinoiden keine Reexpression von Claudin-1.

Um zu untersuchen, ob der Zuwachs von Claudin-1 mRNA nach Retinoidbehandlung mit einer Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression in MCF-7 Zellen korreliert, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Abb.30 zeigt die quantitative Änderung der Claudin-1 Proteinmenge nach 24-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit Retinoiden in einer Konzentration von 300 nM verglichen mit der endogenen Claudin-1 Expression in T47-D Zellen.

In unbehandelten MCF-7 Zellen (C) konnte nur unter Verwendung hoher Antikörperkonzentrationen (50 μ g/ml) eine schwache Western-Blot Bande der endogenen Expression von Claudin-1 detektiert werden, die nach densitometrischer Analyse im Vergleich zur T47-D Bande (100 %) eine relative Bandenintensität von etwa 4 % aufwies. Der relative Zuwachs an Claudin-1 Protein nach Retinoidbehandlung war mit einer 1.4 bis 3.1-fach höheren Expression deutlich geringer im Vergleich zur Zunahme an Claudin-1 mRNA. Die höchsten Mengen an Claudin-1 Protein wurden wiederum nach Inkubation mit RAR- α und RAR- β Agonisten (12.3 % bzw. 10.7 %) sowie nach Behandlung mit dem RAR-Panagonist Arotinoid (8.4 %) erzielt. Zusätzlich zeigte der RXR- α/γ Agonist Targretin eine vergleichsweise starke Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression (11.6 %). Vergleichbare Ergebnisse der Claudin-1 mRNA- und Proteinexpression nach Retinoidbehandlung von MCF-7 Zellen ergaben sich sowohl nach längeren Inkubationszeiten von bis zu 72 h als auch bei höheren Retinoidkonzentrationen bis zu 10 μ M.

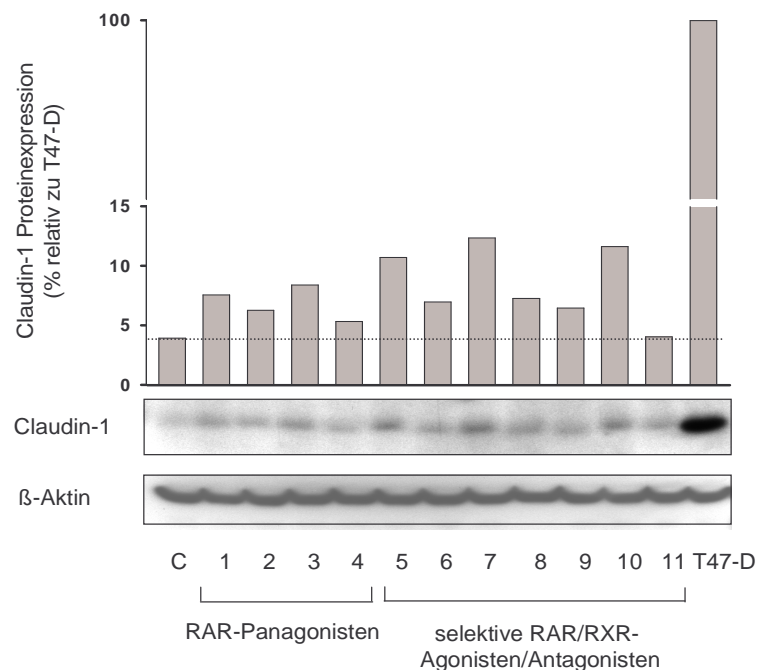


Abb.30: Änderung der Claudin-1 Proteinexpression in konfluenten MCF-7 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Retinoiden. Die Daten wurden bezogen auf die Expression von Claudin-1 in T47-D Zellen normalisiert (100 %). Die Zahlen unter den Balken entsprechen den in Tabelle 2 aufgeführten Retinoid-Substanzen, C ist die unbehandelte MCF-7 Kontrollkultur. Die relative Claudin-1 Proteinmenge wurde durch densitometrische Messung der Western-Blot Banden quantifiziert und der β -Aktin Nachweis diente als interne Ladekontrolle.

4.3.4. Einfluss der Chromatinstruktur

Einen weiteren Mechanismus der epigenetischen Transkriptionskontrolle, der in Tumorzellen häufig dereguliert ist, stellt die Kondensation der Chromatinstruktur durch Anlagerung von Histon-Proteinen an DNA-Bereiche dar (185). Die Chromatinverdichtung wird dabei durch das Zusammenspiel von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und -Deacetylasen (HDACs) gesteuert, die den Acetylierungszustand von Histonen und somit die Auflockerung (Histon-Acetylierung) oder Kondensation (Histon-Deacetylierung) des Chromatins beeinflussen und dadurch die Transkriptionsaktivität des in dem betroffenen DNA-Abschnitt gelegenen Gens regulieren. HATs und HDACs kommen in verschiedenen Isoformen vor und bilden regulatorische Komplexe mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, u.a. mit Retinoid-Rezeptoren, aus (128). Um die potentielle Bedeutung einer veränderten Chromatinstruktur sowie eines möglichen Zusammenwirkens mit Retinoid-Rezeptoren für die Claudin-1 Repression in Brusttumorzellen zu untersuchen, wurde der Effekt potenter HDAC Inhibitoren alleine und in Kombination mit Retinoidsubstanzen analysiert.

4.3.4.1. ELISA-Nachweis der Histon H4 Acetylierung

Für die Analyse der Chromatindekondensation in Brusttumorzellen wurden die Hydroxaminsäurederivate Suberoylanilide-Hydroxaminsäure (SAHA) und Trichostatin A (TSA) sowie die Benzamide MS-275 und CI-994 (N-Acetyl-Dinaline) eingesetzt, für die eine effektive Inhibition der Histon-Deacetylierung nachgewiesen werden konnte (186). Während SAHA, TSA und MS-275 direkt die Aktivität von Histon-Deacetylasen beeinflussen, ist der Mechanismus der Wirkung von CI-994 auf den Acetylierungsstatus von Histonen indirekt und im Detail noch nicht geklärt. Um wiederum unspezifische zytotoxische Effekte dieser Substanzen zu vermeiden, wurden im Vorfeld Effekte auf Zellproliferation und –vitalität in Abhängigkeit verschiedener Substanzkonzentrationen analysiert. Dabei zeigte sich, daß in den untersuchten Brusttumorzelllinien bei Konzentrationen bis 30 nM für TSA, bis 1 µM für MS-275 und SAHA und bis 10 µM für CI-994 keine signifikante Änderungen des Zelltodes oder der Zellteilungsrate bis zu einer Inkubationsdauer von 72 h detektiert werden konnten. Die Änderung des Acetylierungsstatus von Histonproteinen bei nicht-toxischen Konzentrationen wurde mit einem etablierten ELISA-Test in fixierten und permeabilisierten Zellen detektiert (siehe 3.2.1.9). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse in den untersuchten Brusttumorzelllinien nach 24-stündiger Substanzgabe dargestellt.

Zelllinie	MS-275	CI-994	SAHA	TSA
MDA-MB 231 BAG	1.95	1.44	1.28	0.97
MDA-MB 231	2.12	2.07	1.26	0.88
MCF-7	1.82	2.24	1.26	1.32
MCF-7 ADR	1.55	1.75	1.65	1.62
T47-D	1.88	2.16	1.8	1.97
MDA-MB 361	4.60	11.60	0.90	4.00
SK-BR 3	2.72	2.51	1.74	1.95
MDA-MB 435	2.48	2.48	2.10	1.56

Tabelle 4: Relative Zunahme der Acetylierung von Histon H4 in Brusttumorzelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit TSA (30 nM), MS-275 (1 µM), SAHA (1 µM) und CI-994 (10 µM). unbehandelte Kontroll-Zellkultur: 1.0. Die Daten stellen Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten dar.

Es zeigte sich, daß die Substanzen bei den eingesetzten Konzentrationen in fast allen Zellmodellen zu einer Zunahme der Histon H4 Acetylierung gegenüber den unbehandelten Kontrollen (1.0) führten. Die durchschnittliche Zunahme des Signals gemittelt über alle Zelllinien betrug 2.39 für MS-275, 3.38 für CI-994, 1.49 für SAHA und 1.78 für TSA. Vergleichbare Änderungen der Histon H4 Acetylierung konnten bereits nach 6 h Inkubationszeit oder auch bei höheren Konzentrationen (100 nM TSA, 3 µM MS-275 und SAHA, 30 µM CI-994) detektiert werden.

4.3.4.2. Expression von Claudin-1 nach HDAC Inhibition

Um den Effekt der erhöhten Histonacetylierung auf die Transkription des Claudin-1 Gens zu untersuchen, wurden semiquantitative RT-PCR Analysen nach Behandlung mit HDAC Inhibitoren durchgeführt. In Abb.31 sind die Ergebnisse von sechs untersuchten Zellmodellen nach 24-stündiger Substanzgabe dargestellt, da in den Claudin-1 negativen MDA-MB 361 und MDA-MB 435 Zellmodellen selbst nach HDAC Inhibitorbehandlung keine Reexpression von Claudin-1 mRNA nachgewiesen werden konnte.

Es ist ersichtlich, daß CI-994 und SAHA in allen sechs Brusttumorzelllinien eine Erhöhung der Claudin-1 mRNA Expression im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollkulturen induzierten. Der Zuwachs an Claudin-1 mRNA betrug im Mittel 13.9 nach CI-994 bzw. 4.8 nach SAHA-Behandlung. MS-275 bewirkte dagegen nur in den vier Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 231 BAG, T47-D und MCF-7 ADR und TSA nur in der T47-D Zelllinie eine deutliche Erhöhung der Claudin-1 mRNA Menge gegenüber den unbehandelten Kontrollkulturansätzen, wobei die Zunahme gemittelt über alle sechs Zellmodelle 7.3 bzw. 1.1 betrug. Besonders stark wirkte sich die HDAC-Inhibition in MDA-MB 231 BAG Zellen aus, in denen eine relative Erhöhung der Claudin-1 mRNA Menge um den Faktor 57.7 (CI-994) und 17.4 (SAHA) gemessen wurde, was einem mRNA Expressionsniveau von 31 % bzw. 9 % im Vergleich zu unbehandelten T47-D Zellen entspricht. Selbst in T47-D Zellen mit bereits hoher endogener Claudin-1 Expression konnte durchschnittlich eine 4.4-fache Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression nach HDAC Inhibitorbehandlung detektiert werden.

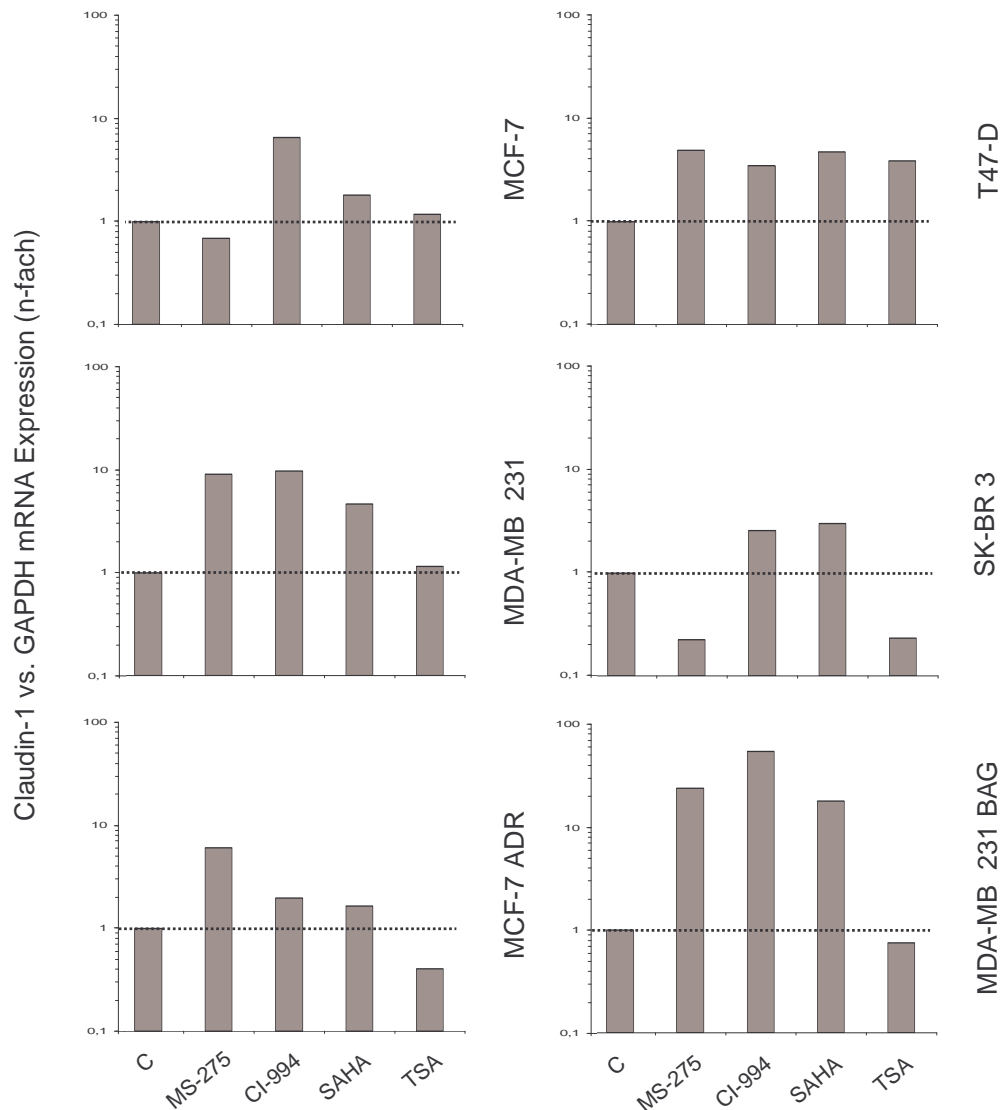


Abb.31: Relative mRNA Expression von Claudin-1 in konfluenten Brusttumorzelllinien nach 24-stündiger Behandlung mit HDAC Inhibitoren MS-275 (1 μ M), CI-994 (10 μ M), SAHA (1 μ M) und TSA (30 nM). Die Claudin-1 mRNA Expression wurde bezogen auf die Expression von GAPDH mRNA normalisiert und das Verhältnis der Expression beider Gene für die unbehandelte Kontrolle (C) als 1.0 gesetzt. Jeder Messwert repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Um zu überprüfen, ob der Zuwachs an Claudin-1 mRNA mit einer erhöhten Expression von Claudin-1 Protein korreliert, wurden Western-Blot Analysen mit HDAC-Inhibitor behandelten MCF-7 ADR, MDA-MB 231 BAG und T47-D Zellen durchgeführt (siehe Abb.32). Dabei zeigte sich, daß die HDAC Inhibition mit CI-994 in MCF-7 ADR sowie MDA-MB 231 BAG Zellen und SAHA nur in MDA-MB 231 BAG Zellen auch zu einer sichtbaren Erhöhung der Claudin-1 Proteinexpression führte. In T47-D Zellen konnte trotz Erhöhung der Claudin-1 mRNA Menge nach HDAC Inhibitorbehandlung keine weitere Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression gemessen werden. Außerdem wurde auch bei längeren Inkubationszeiten mit HDAC-Inhibitoren

bis 72 h in allen untersuchten Zellmodellen keine weitere Zunahme der Claudin-1 mRNA- oder Protein-Expression detektiert.

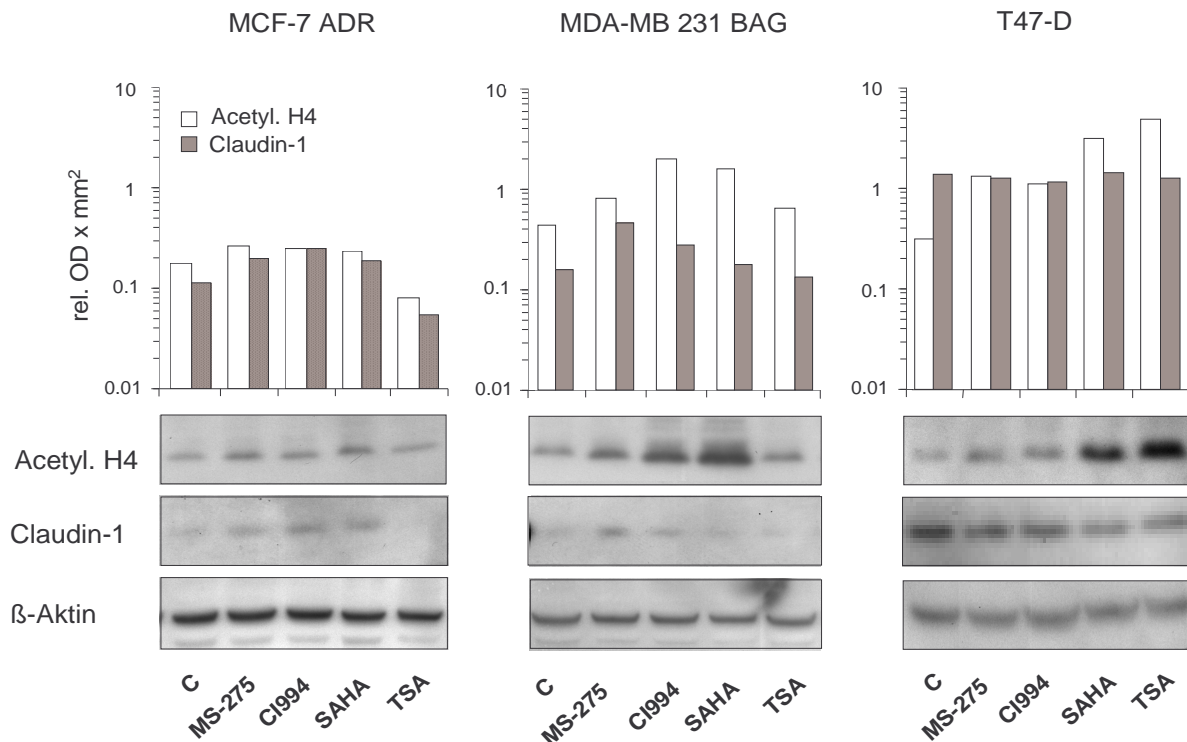


Abb.32: Proteinexpression von Claudin-1 und Histon H4 Acetylierung in konfluenten MCF-7 ADR, MDA-MB 231 BAG und T47-D Zellen vor (C) und nach 24-stündiger Behandlung mit HDAC Inhibitoren MS-275 (1 μ M), CI-994 (10 μ M), SAHA (1 μ M) und TSA (30 nM). Die relativen Expressionsniveaus von Claudin-1 und acetyliertem Histon H4 wurden durch densitometrische Analyse der Western Blot Banden bezogen auf die β -Aktin Expression als interne Ladekontrolle quantifiziert.

4.3.4.3. HDAC Inhibition und Retinoid-Rezeptor Aktivierung

Um eine mögliche synergistische oder additive Wirkung der Inhibition von Histon-Deacetylasen und Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren auf die Claudin-1 Expression zu untersuchen, wurde der Effekt von Kombinationen beider Substanzklassen getestet. Für diese Studien wurden zwei verschiedene Brusttumorzellmodelle mit geringer endogener Claudin-1 Expression untersucht: hochdifferenzierte MCF-7 Zellen, die sowohl nach Retinoid- als auch HDAC Inhibitorgabe mit einer Zunahme der Claudin-1 Expression reagierten, und niedrig differenzierte MDA-MB 231 BAG Zellen, die eine Claudin-1 Expressionserhöhung nach HDAC Inhibition aber keine Expressionsänderung nach Retinoid-Rezeptor Stimulation zeigten. Die verwendeten HDAC Inhibitoren und Retinoid-Rezeptor Aktivatoren wurden in nicht-toxischen Konzentrationen (SAHA, all-trans Retinsäure (t-RA) und Arotinoid je 1 μ M sowie CI-994 10 μ M) eingesetzt. Durchflußzytometrische Analysen zeigten, daß sich in diesem Konzentrationsbereich auch bei Kombinationsgabe

keine additiven Toxizitätseffekte oder größere Änderungen der Zellzyklusverteilung ergaben. In Abb.33 ist Untersuchung der Histon H4 Acetylierung sowie der Claudin-1 Proteinexpression in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach Behandlung mit CI-994, SAHA, t-RA und Arotinoid gezeigt.

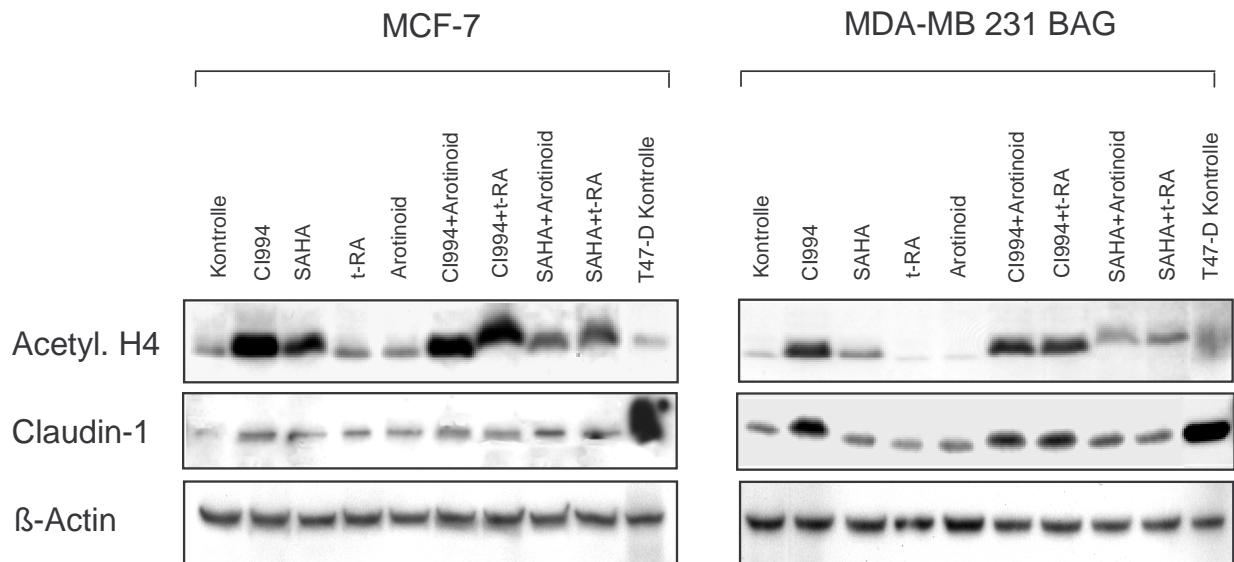


Abb.33: Western Blot Analyse der Histon H4 Acetylierung sowie der Claudin-1 Expression in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach Behandlung mit CI-994, SAHA, all-trans Retinsäure (t-RA) und Arotinoid. T47-D Zellysat wurde als Positiv-Kontrolle für den Nachweis von Claudin-1 aufgetragen; Die Detektion von Beta-Aktin diente als interne Ladekontrolle.

Lediglich CI-994 und SAHA führten zu einer Zunahme der Acetylierung von Histon H4, wobei die Behandlung mit CI-994 in beiden Zelllinien in Übereinstimmung mit dem ELISA-Nachweis (siehe 4.3.4.1) zu einem stärkeren Zuwachs der Histon H4 Acetylierung führte. Retinoid-Rezeptor Aktivatoren t-RA und Arotinoid bewirken keine Änderung des Histon H4 Acetylierungsstatus. Während in MCF-7 Zellen mit HDAC-Inhibitoren und RAR Aktivatoren eine vergleichbare Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression gemessen werden konnte, wurde in MDA-MB 231 BAG Zellen nur nach Behandlung mit CI-994 eine Expressionszunahme von Claudin-1 Protein detektiert. Kombinationen von CI-994 und SAHA mit t-RA oder Arotinoid führten weder in MCF-7 noch in MDA-MB 231 BAG Zellen zu einer synergistischen bzw. additiven Zunahme der Claudin-1 Expression. Vielmehr wurde bei Kombinationsgabe in MCF-7 Zellen eine in etwa vergleichbare Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression induziert, wie sie nach Einzelgabe von SAHA oder CI-994 nachgewiesen werden konnte.

In Tabelle 5 ist die zu Abb.33 gehörige Untersuchung der relativen Claudin-1 mRNA Expression nach Kombinationsgabe von Retinoids-substanzen und HDAC-Inhibitoren gezeigt. Wie bereits analysiert führte die HDAC-Inhibitorbehandlung zu einer Induktion der Claudin-1 mRNA Expression, wobei sich CI-994 verglichen mit SAHA in beiden Zelllinien als effektiver erwies (siehe 4.3.4.2). Die beiden RAR-Panagonisten Arotinoid und t-RA führten wie bereits gezeigt nur zu einer Zunahme der Claudin-1 mRNA Menge in MCF-7 Zellen, nicht jedoch in MDA-MB 231 BAG Zellen (siehe 4.3.3). Nach Kombination beider Substanzklassen war im Unterschied zur Claudin-1 Proteinexpressionsanalyse auf RNA-Ebene sogar eine Verringerung der Claudin-1 mRNA im Vergleich zur Einzelbehandlung detektierbar. So sank die Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression in MCF-7 Zellen nach Arotinoidbehandlung um über 80 %, wenn zusätzlich CI-994 oder SAHA in Kombination eingesetzt wurden. Auch in MDA-MB 231 BAG Zellen verringerte sich die Claudin-1 mRNA nach Behandlung mit CI-994 in Kombination mit t-RA oder Arotinoid um etwa 70 % im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit CI-994 ab.

Substanzen	MCF-7	MDA-MB 231 BAG
CI994	22.9	15.6
SAHA	1.3	7.2
t-RA	37.7	0.8
Arotinoid	100.0	0.5
CI994 + t-RA	8.8	5.3
CI994 + Arotinoid	17.2	4.5
SAHA + t-RA	8.3	3.4
SAHA + Arotinoid	12.7	2.8

Tabelle 5: N-fache Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach Einzel- und Kombinationsbehandlung mit CI-994, SAHA, t-RA (all-trans Retinsäure) und Arotinoid (Inkubationsdauer: 24 h; unbehandelte Kontrollkulturen: 1.0 nach Normalisierung auf GAPDH mRNA Expression). Die Daten stellen Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten dar.

HDAC Inhibitoren und Retinoide sind pleiotrop wirksame Aktivatoren der Gentranskription, die durch Dekondensation der Chromatinstruktur bzw. Aktivierung nukleärer Retinoid-Rezeptor-signalwege die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene beeinflussen (186, 128). Um diese regulatorischen Mechanismen für die Expression Tight Junction assoziierter Proteine in der Brusttumorgenese umfassender zu verstehen, wurde der Effekt von CI-994, SAHA, t-RA und Arotinoid auf die Expression von Claudin-3 und -4, Occludin und ZO-1 in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG analysiert. Semiquantitative RT-PCR Analysen, in denen transkriptionelle Änderungen

der Expression dieser Gene untersucht wurden, ergaben nach Substanzbehandlung keine signifikanten Änderungen der entsprechenden mRNA Expressionsnivaus in beiden Zelllinien. In Abb.35 ist die Untersuchung der Proteinmengen in beiden Zelllinien nach Einzel- und Kombinationsgabe von CI-994, SAHA, t-RA und Arotinoid dargestellt.

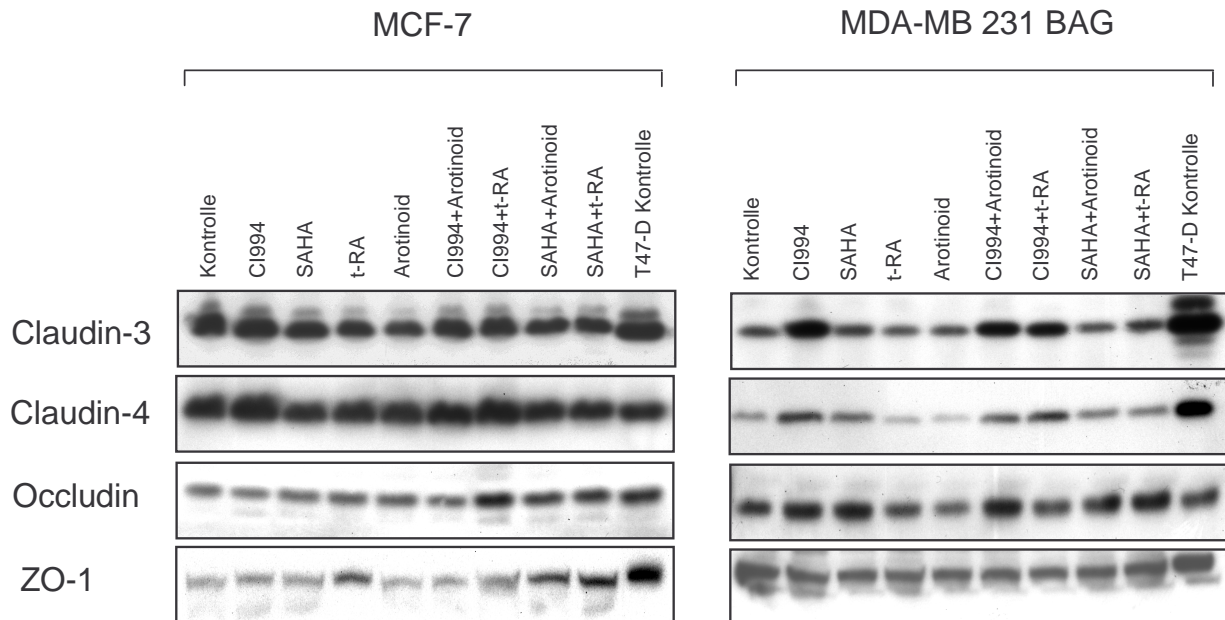


Abb.34: Effekt von CI-994, SAHA, all-trans Retinsäure (t-RA) und Arotinoid auf die Expression anderer Tight Junction assoziierter Proteine in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen. Die aufgetragenen Proben stammen aus dem gleichen Kulturansatz zur Bestimmung der Histon H4 Acetylierung und Claudin-1 Expression, die in Abb.33 gezeigt ist.

In MCF-7 Zellen konnten in Übereinstimmung mit den mRNA Expressionsstudien keine signifikanten Mengenänderungen der untersuchten Tight Junction assoziierten Proteine Claudin-3, Claudin-4, Occludin und ZO-1 detektiert werden. Obwohl in MDA-MB 231 BAG Zellen keine Expressionsänderungen auf transkriptioneller Ebene gefunden werden konnten, führte die Behandlung mit CI-994 zu einer deutlichen Zunahme der Claudin-3, -4 und Occludin Proteinexpression. Die Retinoidbehandlung selbst führte zu keiner Änderung der Expression dieser Tight Junction Proteine, wie auch die Kombinationsbehandlung mit CI-994 und SAHA (Abb.34). In MDA-MB 231 BAG Zellen konnte mit SAHA nur ein schwacher Zuwachs von Claudin-4 und Occludin Protein nachgewiesen werden, der durch Kombination mit Retinoiden sich ebenfalls nicht änderte. Weil Retinoide selbst nicht effektiv waren und die mRNA Mengen der untersuchten Tight Junction Proteine gleich blieben deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die

Chromatindekondensation in MDA-MB 231 BAG Zellen durch einen posttranskriptionellen Mechanismus zu einer Erhöhung der Claudin-3, -4 und Occludin Expression führt.

4.3.4.4. Zelluläre Lokalisation Tight Junction assoziierter Proteine nach HDAC Inhibition

Wie die Untersuchung des Ras-MEK-1 Signalwegs in MDCK Zellen angedeutet haben, kann die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden nicht nur die Expression, sondern auch die zelluläre Lokalisation von Tight Junction Proteinen beeinflussen (127). Um nachzuweisen, ob die Inhibition der Histon-Deacetylierung neben einer Expressionserhöhung von Claudin-1 und anderer Tight-Junction assoziierter Proteine auch Änderungen der zellulären Lokalisation dieser Proteine zur Folge hat, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach CI-994 Behandlung durchgeführt. Abb.35 zeigt die Analyse der Histon H4 Acetylierung bei gleichzeitiger Zellkernfärbung mit DAPI in beiden Zellmodellen nach 24-stündiger CI-994 Inkubation. Da acetyliertes Histon H4 sich vorwiegend im Chromatin mitotischer Zellen findet, konnte auch in unbehandelten, mitotischen MCF-7 Zellen eine starke Färbung der Chromatide detektiert werden (Abb.35 A). Neben sich teilenden Zellen zeigten nach CI-994 Behandlung auch über 90 % der Interphase-Zellen eine deutlich intensivere Färbung der Zellkerne (Abb.35 B). In unbehandelten MDA-MB 231 BAG Zellkulturen konnte zwar keine ausgeprägte Markierung von acetyliertem Histon H4 in mitotischen Zellen detektiert werden, jedoch war eine schwache Zellkernfärbung von Interphasezellen erkennbar, die nach CI-994 Behandlung signifikant zunahm (Abb.35 E, F).

Abb.36 und Abb.37 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Kolo-kalisation von Claudin-1, -3, -4 und Occludin mit ZO-1 in beiden Zellmodellen vor und nach Behandlung mit CI-994. In Abb.36 A ist zu sehen, daß innerhalb der unbehandelten MCF-7 Zellpopulation nur einzelne Claudin-1 positive Zellen detektierbar waren, die eine Membranlokalisation des Proteins mit punktuierter zytoplasmatischer Färbung aufwiesen. Nach CI-994 Exposition nahm die Anzahl Claudin-1 positiver MCF-7 Zellen deutlich zu. Während in unbehandelten MCF-7 Zellkulturen bei 400-facher Vergrößerung pro 5 Gesichtsfelder 1-2 Claudin-1 positive Zellen detektiert werden konnten, waren nach CI-994 Behandlung pro Gesichtsfeld durchschnittlich 1-2 Claudin-1 positive Zellcluster bestehend aus 3-8 Zellen nachweisbar (Abb.36 E). Die einzelnen Zellen dieser Claudin-1 positiven Subpopulation zeigten jeweils eine membranständige sowie eine intrazelluläre Lokalisation von Claudin-1 in größeren vesikulären Strukturen. Unabhängig von der CI-994 Behandlung war sowohl für die vesikuläre als auch die membranständige Färbung von Claudin-1 eine Kolo-kalisation mit ZO-1 erkennbar (Abb.36 A, B und E, F). Die anderen untersuchten Tight Junction assoziierten Proteine Claudin-3, Claudin-4, Occludin und ZO-1 zeigten alle ein netz-

werkartiges Kolokalisationsmuster in unbehandelten MCF-7 Zellen, das sich auch nach Inhibition der Histon-Deacetylierung durch CI-994 nicht änderte (Abb.36 C/D, G/H, Abb.37 A-H).

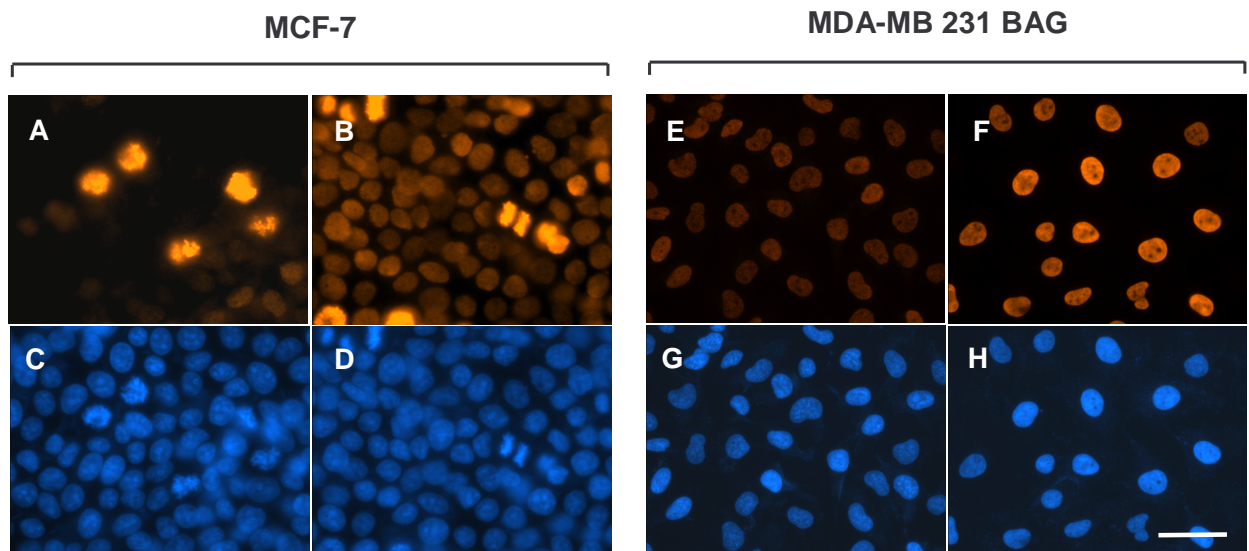


Abb.35: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Histon H4 Acetylierung in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit CI-994 (10 µM). Nachweis der acetylierten Form von Histon H4 (orange) vor (A,E) und nach Behandlung mit CI-994 (B,F); Darstellung der Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau) jeweils darunter. Balken: 20 µm.

Im Gegensatz zu MCF-7 Zellen konnte in unbehandelten MDA-MB 231 BAG Zellen nur eine zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-1, -4, Occludin und ZO-1 nachgewiesen werden. (Abb.36 I-L; Abb.37 K, L). Claudin-3 wies eine ausgeprägte nukleär-zytoplasmatische Färbung auf (Abb.37 I). Nach CI-994 Behandlung von MDA-MB 231 BAG Zellen wurde eine Zunahme der Zellgröße mit einer Vergrößerung zytoplasmatischer Zellbereiche in mehr als 50 % aller Zellen beobachtet. Im Zuge dieser morphologischen Änderungen war eine Relokalisation von Claudin-1, Occludin und ZO-1 an Zell-Zellkontaktstellen beobachtbar, die jeweils zu einer Membranlokalisierung mit unterbrochenen und gepunkteten Linienstrukturen der Plasmamembranfärbung führte (Abb.36 M-P). In CI-994 behandelten MDA-MB 231 BAG Zellen mit membranständiger Expression von Claudin-1 und Occludin war außerdem eine verstärkte zytoplasmatische Fluoreszenzfärbung auffällig, die vermutlich auf eine stimulierte Proteinbiosynthese beider Moleküle am endoplasmatischen Retikulum und deren Golgi-Transport hindeutet (Abb.36 M,O). Die nukleär-zytoplasmatische bzw. zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-3 (Abb.37 I) und Claudin-4 (Abb.37 K) wurden durch die Behandlung mit CI-994 nicht wesentlich verändert (Abb.37 M-P).

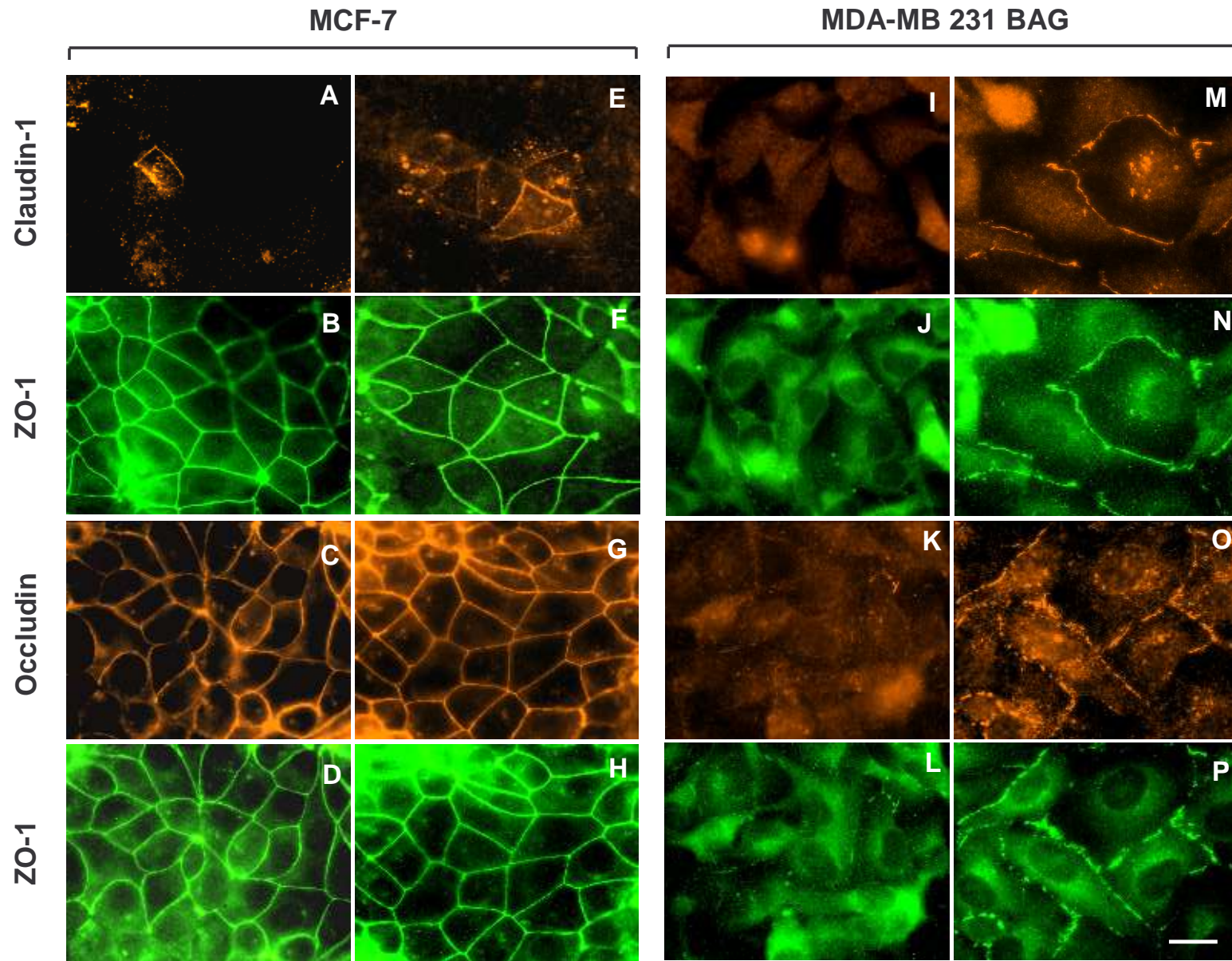


Abb.36: Expression und Lokalisation von Claudin-1, Occludin und ZO-1 nach Behandlung von MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen mit CI-994 (10 μ M). Claudin-1 und Occludin (jeweils orange) wurden gemeinsam in einer Doppelfärbung mit ZO-1 (grün) detektiert; Zusammengehörige Bilder sind untereinander dargestellt. A-D bzw. I-L): unbehandelte Zellen; Bilder rechts E-H bzw. M-P: CI-994 behandelte Zellen; Balken: 15 μ m.

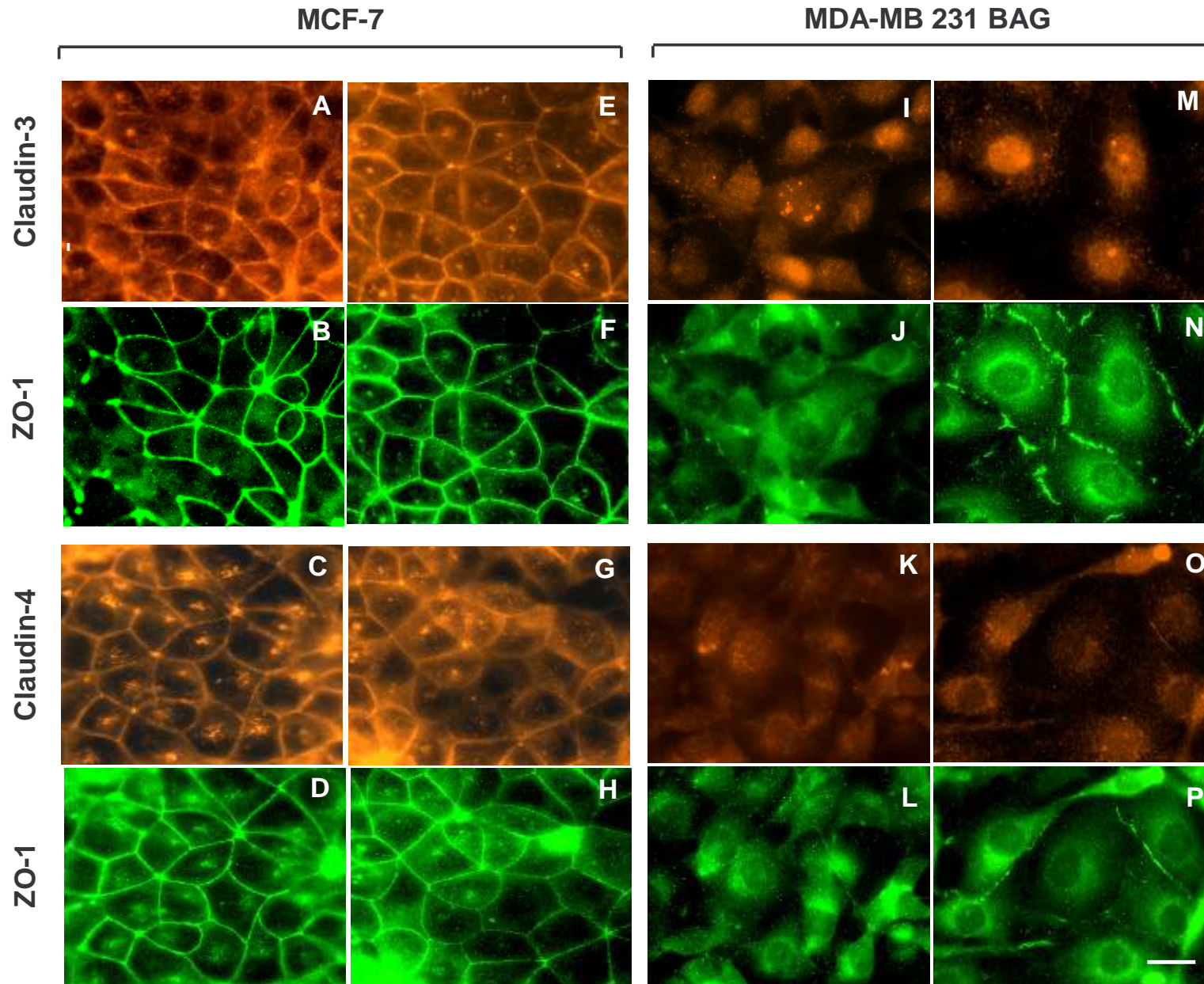


Abb.37: Expression und Lokalisation von Claudin-3 und Claudin-4 nach Behandlung von MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen mit CI-994(10 μ M). Claudin-3 und -4 (orange) wurden in einer Doppelfärbung mit ZO-1 (grün) detektiert; Zusammengehörige Bilder sind untereinander dargestellt. A-D bzw. I-L: unbehandelte Zellkulturen; E-H bzw. M-P: CI-994 behandelte Zellen; Balken: 15 μ m.

4.3.4.5. Einfluß der HDAC Inhibition auf Zellmorphologie und Zytoskelett Organisation

Untersuchungen an verschiedenen Brusttumorzellen zeigten, daß die Zunahme der Histon-Acetylierung nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren morphologisch sichtbare, phänotypische Änderungen im Sinne einer Pseudo-Redifferenzierung hervorrufen kann (187-190). Unter anderem wurde von Munster et al. beobachtet, daß eine Inkubation von MCF-7 Zellen mit SAHA bei höheren Konzentrationen zu zellmorphologischen Veränderungen mit einer Abnahme des Volumenverhältnisses zwischen Zellkern und Cytoplasma sowie einer Zunahme der gesamten Zellgröße führte (190). Um zu analysieren, ob CI-994 die Morphologie und das Aktin-Zytoskelett von MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen beeinflusst, wurden Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb.38 zusammengestellt.

Unbehandelte MCF-7 Zellen wiesen eine mehr runde Zellform auf (A). Neben kleinen zytoplasmatischen Bereichen und großem Volumenanteil des Zellkerns konnten in jedem Nukleus zwei bis sechs Nukleoli beobachtet werden. Zwischen benachbarten Zellen bildeten sich definierte und geschlossene Zellkontaktstellen aus. Das an der Strukturgebung der Zellen maßgeblich beteiligte intrazelluläre Mikrofilament-Netzwerk bestehend aus filamentösem Aktin war mit ZO-1 kolokalisiert und wies eine für Drüsenepithelzellen typische kortikale, subplasmalemmale Ausrichtung auf (Abb.38 B, C). Nach Inkubation von MCF-7 Zellen mit 10 µM CI-994 konnten innerhalb des Beobachtungszeitraum von 48 h keine signifikanten Unterschiede bezüglich Zellmorphologie (Abb.38 D) und Organisation des Aktin-Zytoskelett (Abb.38 E) im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Dagegen zeigten MDA-MB 231 BAG Zellen nach CI-994 Behandlung deutliche morphologische Änderungen. Unbehandelte Zellen wiesen mehrere Merkmale niedrigdifferenzierter Tumorzellen auf, wie beispielsweise eine große Zellkern/Zytoplasma-Relation und die Ausbildung von Pseudo- und Filopodien (Abb.38 G). Die subplasmalemmale Anreicherung der Aktin-Mikrofilamente war im Vergleich zu MCF-7 Zellen weniger strukturiert und nur an wenigen Zell-Zellkontakten deutlich ausgeprägt (Abb.38 H). Filamentöses Aktin lag in zahlreichen Stressfasern vor, welches ein Merkmal hoher Zellmotilität darstellt und das hochinvasive Potential von MDA-MB 231 BAG Zellen zum Ausdruck bringen (169). Zusätzlich konnte keine Kolokalisation des Aktin-Zytoskeletts mit cytosolischem ZO-1 detektiert werden (Abb.38 I). Nach Behandlung von MDA-MB 231 BAG Zellen mit CI-994 waren deutliche morphologische Änderungen erkennbar (J). So konnte eine deutliche Zunahme der gesamten Zellgröße mit einer Vergrößerung zytoplasmatischer Bereiche beobachtet werden, wobei sich die Zellkerngröße sowie die Anzahl an Nukleoli pro Zellkern nicht auffällig veränderte. Dabei betrug der mittlere Zelldurchmesser unbehandelter

Zellen etwa 19.5 μm und nahm nach CI-994 Behandlung um 30 % auf etwa 27.5 μm zu. Desweiteren bildeten benachbarte Zellen mehr definierte Zell-Zellkontakte aus, so daß aneinandergrenzende Zytoplasmabereiche stärker fusioniert wirkten. Gleichzeitig fand eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt: Bündel aus Aktin-Mikrofilamenten ordneten sich vermehrt im Zellkortex an, während sich die Zahl zytoplasmatischer Stressfasern gleichzeitig sichtbar verringerte (Abb.38 K). Schließlich konnte eine Kolokalisation des kortikal ausgerichteten Aktin-Zytoskeletts gemeinsam mit der Relokalisation von ZO-1 an die Zytoplasmamembran beobachtet werden (Abb.38 L).

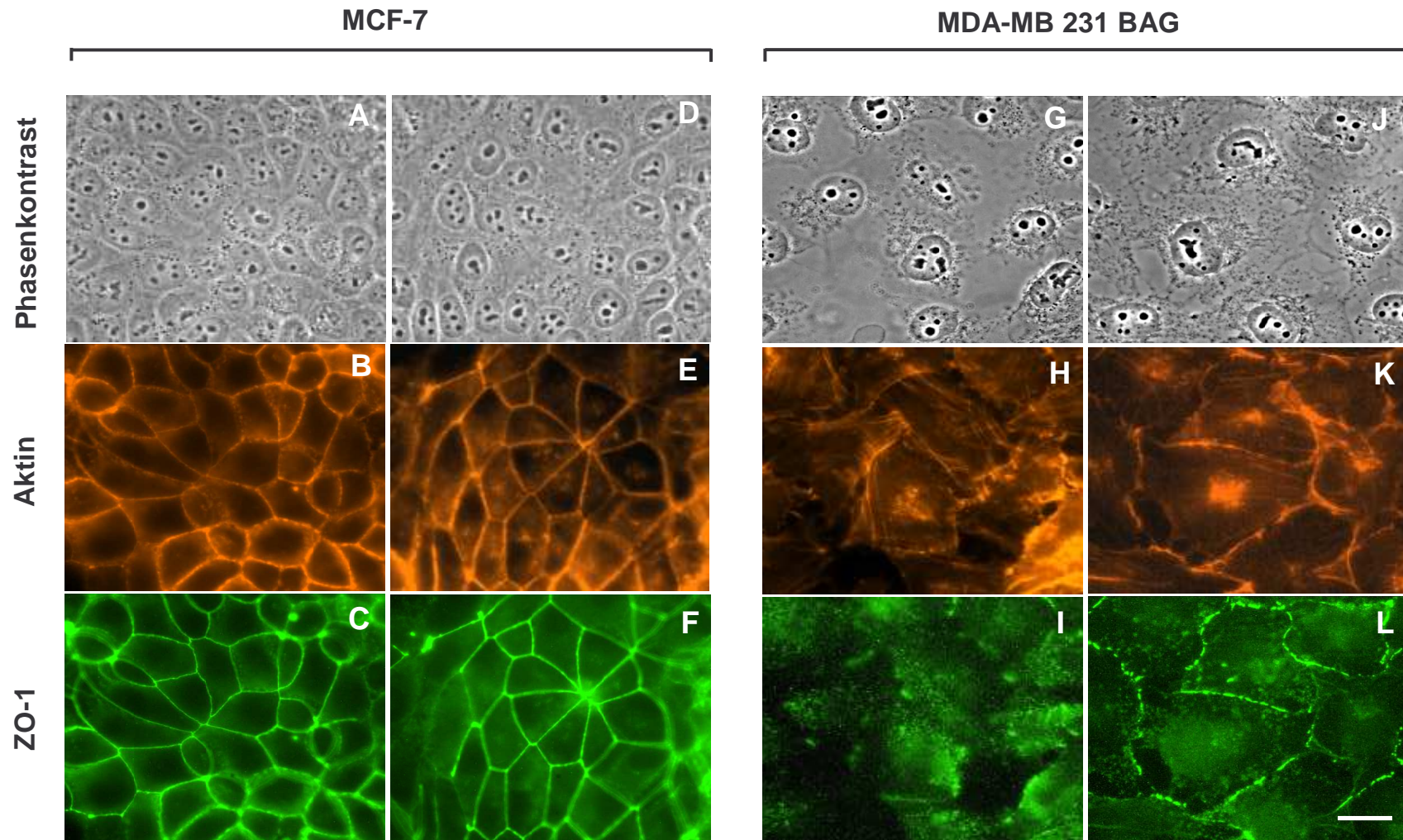


Abb.38: Zellmorphologie und des Aktin-Zytoskelett in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach Behandlung mit CI-994 (10 μ M). Phasenkontrast-Mikroskopie der Zellen vor(A,G) und nach CI-994 Inkubation (D,J). Aktin (orange) wurde in einer Doppelfärbung mit ZO-1 (grün) detektiert; Zusammengehörige Bilder sind untereinander dargestellt. unbehandelte Zellkulturen(A-C, G-I); CI-994 behandelte Zellkulturen (D-F, J-L). Balken: 15 μ m.

3.3.4.6. Analyse der Tight Junction Diffusionsbarriere nach HDAC-Inhibition

Um zu untersuchen, ob die CI-994 induzierten Änderungen der Expression und Lokalisation Tight Junction assoziierter Proteine zu einer veränderten parazellulären Diffusionsbarriere führen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) konfluenten Zellmonolayer nach Inkubation mit CI-994 bestimmt. Abb.39 zeigt die Messung des TER von MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellmonolayern nach Substanzexposition über einen Zeitraum von 48 h. In beiden Zelllinien konnte sowohl in den Kontrollkulturen als auch nach CI-994 Behandlung ein Zuwachs des TER im zeitlichen Verlauf beobachtet werden, der in einer weiteren Zunahme der Zellkonfluenz begründet ist. Allerdings zeigten sich in dem Beobachtungszeitraum jeweils keine signifikanten Unterschiede des TER zwischen Kontroll- und CI-994 behandelten Zellmonolayern. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 Abb.3 gezeigt, wiesen geschlossene Zellschichten aus MDA-MB 231 BAG Zellen eine deutlich höhere Ionendurchlässigkeit verglichen mit MCF-7 Zellen auf. Zu jedem Zeitpunkt konnte unabhängig von der Behandlung mit CI-994 für MCF-7 Zellen ein 2-3 mal höherer transepithelialer Widerstand im Vergleich zu MDA-MB 231 BAG Zellen gemessen werden.

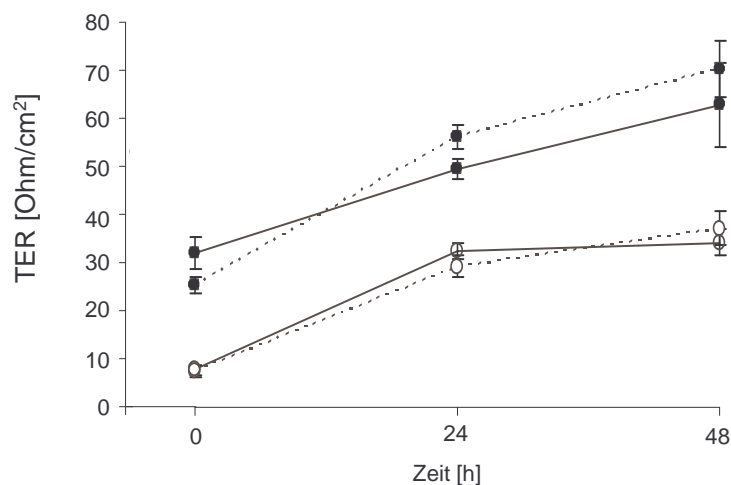


Abb.39: Funktionelle Untersuchung der Tight Junction Diffusionsbarriere in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen nach Behandlung mit CI-994 (10 μ M). Die Ionendurchlässigkeit der Zellmonolayer wurde durch Messung der transepithelialen elektrischen Resistenz (TER) über einen Zeitraum von 48 h bestimmt. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachbestimmungen dar. MCF-7: geschlossene Kreise, MDA-MB 231 BAG: offene Kreise. Durchgezogene Linie unbehandelte Zellayer und gestrichelte Linie CI-994 behandelte Zellayer.

5. Diskussion

Tight Junctions sind Zell-Zellkontakte, die eine Abdichtung des Interzellulärspaces zwischen benachbarten Epithelzellen bewirken und in normalen epithelialen Zellschichten die Funktion einer selektiven parazellulären Diffusionsbarriere für Ionen und Moleküle ausüben (50). Die bis heute bekannten molekularen Komponenten von Tight Junctions sind integrale Membranproteine der Claudin-Familie und Occludin sowie intrazellulär assoziierte PDZ-Domänenproteine wie die Zonula Occludens Proteine (66). In histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen konnten in verschiedenen soliden Tumoren abberante Tight Junction Strukturen und Membranlokalisation sowie eine dysregulierte Expression Tight Junction assoziierter Proteine nachgewiesen werden (150-166). Funktionelle Untersuchungen an in vivo Colonkarzinomen zeigten außerdem, daß der Verlust der Expression von Tight Junctions einen Verlust der Diffusionsbarriere zur Folge hat (155). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß der Expressionsverlust von Tight Junctions zu einer verbesserten parazellulären Diffusion von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in soliden Tumoren beiträgt und damit einen entscheidenden, fördernden Schritt in der Tumorprogression darstellt (148, 149).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Bedeutung des Tight Junction Moleküls Claudin-1 sowie die am Expressionsverlust von Claudin-1 beteiligten zellulären, regulatorischen Mechanismen in der Brusttumorgenese zu untersuchen. Die Gensequenz des humanen Claudin-1 wurde 1998 mit der Differential Display Technik etwa zeitgleich mit der Isolierung des homologen murinen Claudin-1 Proteins durch Vergleich der mRNA Expression seneszenten und proliferierender normaler Brustepithelzellen identifiziert (159). Die Untersuchung der Claudin-1 mRNA Expression verschiedener Brusttumorzelllinien ergab, daß deren Claudin-1 Transkript im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen stark verringert exprimiert oder nicht mehr nachweisbar war (159). Eine nachfolgend durchgeführte Charakterisierung und Sequenzanalyse des Claudin-1 Gens in 189 Brusttumorpatientinnen mit sporadisch aufgetretenen oder familiär bedingten Tumoren sowie in 11 Brusttumorzelllinien ergab keine Hinweise auf einen Expressionsverlust aufgrund von Mutationen der Claudin-1 Gensequenz oder promotornaher Sequenzbereiche (167).

Um ein möglichst umfassendes Bild potentieller epigenetischer Regulationsmechanismen von Claudin-1 und dessen Phänotypbedeutung in der Brusttumorgenese zu erhalten, wurden Untersuchungen an acht Brusttumorzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades durchgeführt. Dabei wurde die Auswahl der Zelllinien nach Sommers et al. aufgrund von Dedifferenzie-

rungskriterien wie in vitro Invasivität sowie Expression von Markermolekülen der Zelldifferenzierung wie ZO-1, E-Cadherin und Vimentin getroffen (172).

Ein erstes wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß die Claudin-1 mRNA- und Proteinexpression in Brusttumorzelllinien unter Konfluenzbedingungen in vitro miteinander korrelieren (Abb.1). In Übereinstimmung mit den Northern-Blot Analysen von Swisshelm et al. konnte mittels RT-PCR ermittelt werden, daß sieben der acht untersuchten Brusttumorzellmodelle in konfluenter Zellkultur deutlich geringere oder nicht detektierbare Claudin-1 mRNA Mengen im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen HMECs aufweisen. Die parallel durchgeführte Analyse der Claudin-1 Proteinexpression ergab, daß eine geringe Expression von Claudin-1 mRNA mit einer stark verringerten oder unterhalb der Nachweisgrenze gelegenen Claudin-1 Proteinexpression korreliert, wobei nur hochdifferenzierte T47-D Brusttumorzellen eine mit HMECs vergleichbar hohe Expression von Claudin-1 mRNA und Protein aufweisen.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Claudin-1 Expression in nativ Claudin-1 exprimierenden T47-D Zellen zeigten eine für Tight Junction Proteine physiologische membranständige Lokalisation von Claudin-1 ausschließlich an Zell-Zellkontakten mit nur geringer vesikulär zytoplasmatischer Färbung (Abb.2, 160). Die vergleichende Untersuchung der Claudin-1 Expression in subkonfluenten und konfluenten T47-D Zellkulturen ergab, daß zwar die Expression von Claudin-1 Protein, nicht jedoch die Menge vorhandener Claudin-1 mRNA von der Etablierung von Zell-Zellkontakten abhängt (Abb.2). Dieser überraschende und bisher nicht beschriebene Befund deutet darauf hin, daß neben einer transkriptionellen Kontrolle des Claudin-1 Gens ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus für die Synthese sowie den gerichteten Membrantransport von Claudin-1 existiert, der durch die Ausbildung zwischenzellulärer Kontakte gesteuert wird.

Für die zellkontaktabhängige Expression von Claudin-1 Protein sowie dessen zellkontaktspezifisches Homing ergeben sich folgende hypothetische Regulationsmechanismen: 1) Steuerung des Claudin-1 Membranlokalisation sowie der Claudin-1 Proteinstabilität durch Einbau in die Plasmamembran mit direkten homo- oder heterophilen Interaktionen an Zell-Zellkontaktstellen für die Etablierung stabiler Tight Junctions, und/oder 2) Steuerung des Claudin-1 Membrantransports und der Claudin-1 Proteinbiosynthese durch Zell-Zellkontakt vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden.

Die erste Hypothese setzt eine geringe konstitutive Expression von Claudin-1 Protein sowie ein Gleichgewicht des Membrantransports und einer kontinuierlichen Internalisierung von membranständigem Claudin-1 mit anschließender Degradation oder einen Recyclingmechanismus in Zellen ohne Zell-Zellkontakt voraus. Erst die interzelluläre Kontaktierung der extrazellulären Domänen

eines Claudin-1 Moleküls mit einem zweiten Claudin-1 Molekül oder anderen Mitgliedern der Claudin-Familie in sich berührenden Zellen würde zur Stabilisierung von Claudin-1 Protein in der Plasmamembran führen. Dabei könnten initiale homo- oder heterophile Dimerisierungen als Kristallisationspunkte für die Anlagerung weiterer Claudin-1 Moleküle in der Plasmamembran dienen und so an der Polymerisation von Claudin-1 in homo- oder heteropolymeren Tight Junction Strangstrukturen ähnlich einem Reißverschlussverfahren beteiligt sein. Diese Hypothese wird durch elektronenmikroskopische Studien von Furuse et al. gestützt, in denen die Ausbildung von Tight Junctions Strukturen nach Transfektion und Kokultivierung von nicht-epithelialen Maus L Fibroblasten mit murinem Claudin-1, -2 und -3 zu einer Membranlokalisation mit der Formation von Tight Junction Strangstrukturen in der Plasmamembran führte (89). Die Kokultivierung von Claudin-1 und Occludin positiver Maus L Fibroblasten resultierte allerdings nicht in einer Kopolymerisation beider Proteine zu Tight Junction Strangstrukturen, sondern führte zu einer zytoplasmatischen Lokalisation beider Proteine.

Die zweite Hypothese geht von einer Aktivierung Zell-Zellkontakt abhängiger intrazellulärer Signaltransduktionswege für die Regulation der Claudin-1 Proteinexpression und Membranlokalisation aus. Die Etablierung von Zell-Zellkontakten und die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden könnte dabei durch homophile Wechselwirkungen von Zelladhäsionsmolekülen z.B. der Cadherinfamilie in sich berührenden Zellen vermittelt werden. So wurde in MDCK Hundezellen gezeigt, daß die Ca^{2+} -Ionen vermittelte Zelladhäsion durch E-Cadherin nicht nur am Aufbau der Adherens Junction und Desmosomen beteiligt ist, sondern auch für die Assemblierung von Tight Junction Strukturen und der Regulation der Tight Junction Diffusionsbarriere bedeutsam ist (191-193). Eine allgemeine Bedeutung von E-Cadherin für den Membrantransport von Claudin-1 wird jedoch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Lokalisation von Tight Junction Molekülen in Epithelien von homozygoten E-Cadherin knock-out Mäusen in Frage gestellt, in denen gezeigt werden konnte, daß Claudin-1 und ZO-1 auch in Abwesenheit von E-Cadherin an der Zytoplasmamembran von Follikelzellen der Schilddrüse lokalisieren (194). Ebenso ist eine durch Zonula Occludens Proteine vermittelte Signalsteuerung der Claudin-1 Regulation unwahrscheinlich, da Furuse et al. in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Claudin-1 transfizierten Maus L-Fibroblasten zeigen konnten, daß die Bildung homopolymerer Strangstrukturen unabhängig von der Expression der ZO-Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 stattfindet (89). Letztlich kann aber zwischen beiden Hypothesen oder einer Synthese beider nicht entschieden werden, da bezüglich einer möglichen, kontaktabhängigen Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade zur Claudin-1 Membranlokalisation- und stabilisierung nur ungenügende Daten in der Literatur vorliegen.

In vitro Untersuchungen an MDCK Hundezellen zeigten, daß Claudin-1 möglicherweise eine funktionelle Komponente von Tight Junctions darstellt die zu einer Inhibition der parazellulären Ionen- und Molekulpassage führt (94). Die Bedeutung von Claudin-1 für die Regulation der Molekülpermeation in normalem Epithelgewebe konnte in in vivo Studien an Claudin-1 knock-out Mäusen eindrucksvoll dargestellt werden (96, 97). Da jedoch die Rolle von Claudin-1 in Tumorzellen nur unzureichend bekannt ist, war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, welche physiologische Bedeutung dem Expressionsverlust von Claudin-1 in Brusttumorzellen zukommt. Deshalb wurde Claudin-1 durch retroviralen Gentransfer in Claudin-1 negative Brusttumorzellen eingebracht. Da eine Überlagerung des Phänotyps der Claudin-1 Reexpression durch andere Claudine möglichst vermieden werden sollte, wurden MDA-MB 361 Zellen als Brusttumorzellmodell verwendet, in denen weder Claudin-1 noch andere transmembranöse Tight Junction Komponenten wie Claudin-2, -3, -4 noch Occludin nachgewiesen werden konnte (Abb.4).

Aus einer Population von Claudin-1 retroviral transduzierter MDA-MB 361 Zellen wurde mit Hilfe einer FACS-Klonierung Claudin-1 positive Tochterzellklonpopulationen mit stabiler Claudin-1 Expression generiert. Für die physiologischen Studien wurden zwei Tochterzellklone mit jeweils hoher Claudin-1 Expression aber unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation von Claudin-1 Protein ausgewählt (Abb.5 und Abb.6). Während Zellen des Klon 2 Zellpopulation primär zytoplasmatische Claudin-1 Färbung mit nur teilweise punktuell vorhandener Membranlokalisation aufwiesen, zeigten Zellen von Klon 6 eine netzwerkartige Lokalisation von Claudin-1 ausschließlich an der Zytoplasmamembran. In einer transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung konnten deshalb auch nur in MDA-MB 361 Klon 6 Zellen stark kontrastierte Bereiche entlang der Zytoplasmamembran an Zell-Zellkontaktstellen nachgewiesen werden (Abb.6). Die Untersuchung von Zell-Zellkontakten mit dem Gefrierätz-verfahren ergab desweiteren zwei wichtige Befunde: Erstens führte die hohe Konzentration von Claudin-1 Protein an der Plasmamembran von MDA-MB 361 Klon 6 Zellen zur Ausbildung kontinuierlicher und mehrfach verzweigter Tight Junction ähnlichen Strangstrukturen an Zell-Zellkontakten, während in Claudin-1 negativen MDA-MB 361 Zellen keine Tight Junction ähnliche Strukturen festgestellt werden konnten (Abb.7). Zweitens waren die durch Claudin-1 Expression generierten Tight Junctions nicht ausschließlich auf den apikalen Bereich der Plasmamembran an Zell-Zellkontakten beschränkt, sondern wiesen eine flächige Verteilung über den gesamten Membranschnitt der untersuchten Zell-Zellkontaktstellen auf, ähnlich den in Maus L Fibroblasten beschriebenen Verteilungsmuster nach konstitutiver, artifizieller Überexpression von Claudin-1 (89).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Mechanismen für den Membrantransport von Claudin-1 sowie die Ausbildung von Tight Junction Strukturen offensichtlich in Claudin-1 negativen Brusttumorzellen noch intakt sind. Zusätzlich scheint aufgrund einer starken zytoplasmatischen Lokalisation von Claudin-1 in Klon 2 Zellen ein dualer Regulationsmechanismus getrennt für Expression und Homing zu existieren. Auf jeden Fall gelang es mit MDA-MB 361 Klon 2 und Klon 6 Zellen Modellsysteme zu generieren, die mit dem klinischen Expressionsbild von Brusttumorzellen in vivo Brusttumoren vergleichbar sind, in denen die ursprüngliche Membranlokalisation von Claudin-1 in normalen Brustepithelgewebe in rein zytoplasmatisches Homing in differenzierten Brusttumorzellen übergeht bis sich letztlich die Claudin-1 Expression in dedifferenzierten Brusttumorzellen fast vollständig verliert (160).

Eine vergleichende Analyse des parazellulären Molekülfluxes in konfluenten MDA-MB 361 Zellkulturen ergab einerseits, daß die Claudin-1 Reexpression zur Ausbildung einer funktionellen Diffusionsbarriere führt und andererseits, daß die parazelluläre Flux-Inhibition für Markermoleküle unterschiedlichen Molekulargewichts mit der Qualität der Claudin-1 Membranlokalisation korreliert (Abb.8). So war die parazelluläre Diffusionsrate von 0.3, 3 und 40 kD FITC-Dextranen in MDA-MB 361 Klon 6 Zellen durchschnittlich um 36 % reduziert, während die MDA-MB 361 Klon 2 Zellpopulation nur eine Abnahme um 17 % gegenüber der Kontrolle zeigte. Während McCarthy et al. nach Überexpression von murinem Claudin-1 in MDCK Hundezellen mit dem Befund einer erniedrigten parazellulären Ionen-Fluxrate bei gleichzeitig erhöhter Diffusionsrate ungeladener Moleküle zu widersprüchlichen Ergebnissen kam (95), bestätigen Daten von Inai et al. die an MDA-MB 361 Zellen gemessene Flux-Inhibition. Nach Transfektion von MDCK Zellen mit Myc-Tag markiertem Claudin-1 konnte er phänotypisch eine reduzierte Fluxrate von Ionen sowie von ungeladenen Molekülen beobachten (94).

Da parentale Claudin-1 negative MDA-MB 361 Zellen weder Claudin-2, -3 und -4 noch Occludin exprimieren, kann ausgeschlossen werden, daß diese Transmembranproteine des Tight Junction Komplexes an der Formation funktioneller Tight Junctions in Claudin-1 positiven MDA-MB 361 Zellen beteiligt sind (Abb.4). Der Vergleich der parazellulären Diffusionsbarriere in verschiedenen Brusttumorzelllinien zeigte, daß parentale MDA-MB 361 Zellen sowie ebenfalls Claudin-1 negative MDA-MB 435 Zellen die höchsten parazellulären Diffusionsraten für Ionen und Moleküle aufwiesen (Abb.3). Zelllinien mit nur schwacher Expression von Claudin-1 wie MCF-7 ADR und MDA-MB 231 BAG zeigten hingegen eine deutlich reduzierte parazelluläre Molekül- und Ionenpermeabilität. Aus der Tatsache, daß die MCF-7 Zelllinie mit sehr geringer endogenen Claudin-1 Expression jedoch eine vergleichbar hohe Reduktion der parazellulären Diffusionsrate wie Claudin-1 hochexprimierende T47-D Zellen aufwies, mußte aber geschlossen werden, daß

neben Claudin-1 möglicherweise noch andere Claudine die Dichtigkeit von Tight Junctions beeinflussen können. In weitergehenden Untersuchungen konnte dann auch ein heterogenes Expressionsmuster von Claudin-2 bis -4 in HMECs und den acht analysierten Brusttumorzelllinien nachgewiesen werden (Abb.4).

In vitro Untersuchungen an Maus L Fibroblasten und MDCK Zellen weisen darauf hin, daß der Einbau von Claudin-2 in Tight Junction Stränge zur Ausbildung diskontinuierlicher Tight Junction Strukturen sowie zu einer erhöhten parazellulären Fluxrate von Ionen führt (91). Desweiteren wurde die Expression von Claudin-2 in Epithelien mit hoher Durchlässigkeit für Ionen z.B. im proximalen Nierentubulus nachgewiesen (66). Da Claudin-2 jedoch in keiner der untersuchten Zellmodelle nachgewiesen wurde, ist eine parazelluläre Permeationsbarrierekontrolle durch Variation der Claudin-2 Expression in Brusttumorzellen auszuschließen.

Die Claudin-1 negativen Zelllinien MDA-MB 361 und MDA-MB 435 mit einer hohen Tight Junction Permeabilität waren bezüglich der Expression aller untersuchten Claudin-2 bis -4 Proteine ebenfalls negativ, während alle anderen Zellmodelle mit einer reduzierten parazellulären Ionen- und Molekülpassage eine unterschiedlich hohe Expression von Claudin-3, -4 und Occludin zeigten. In T47-D und MCF-7 Zellen zeigte sich ein hohes Expressionsniveau von Claudin-3 und -4, in MDA-MB 231, MDA-MB 231 BAG und MCF-7 ADR Zellen hingegen nur eine hohe Claudin-4 Expression. Die von normalen Brustepithelgewebe abgeleiteten HMEC Zellen wiesen eine ähnlich hohe Expression von Claudin-1 wie T47-D Zellen auf, zeigten aber eine geringere Claudin-4 Expression und waren bezüglich der Expression von Claudin-2 und -3 negativ. Zudem war Claudin-3 in 3 von 8 und Claudin-4 in 6 von 8 verschiedenen Brusttumorzelllinien im Vergleich zu HMECs deutlich überexprimiert. Aufgrund der Expressionsverteilung von Claudinen in verschiedenen normalen Epithelgeweben (81) sowie den Ergebnissen von Furuse et al. (89), in denen eine Homo- und Heteropolymerisierung verschiedener Claudine in Tight Junction Strängen nachgewiesen wurde, geht man derzeit davon aus, daß der Einbau und das Mischungsverhältnis unterschiedlicher Claudin-Spezies die Qualität der Tight Junction Diffusionsbarriere unterschiedlicher Epithelien bestimmen. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß neben Claudin-1 entweder Claudin-3, Claudin-4 oder Occludin alleine, in Kombination oder in Kombination mit anderen nicht bekannten Faktoren für die Aufrechterhaltung der parazellulären Diffusionsbarriere in Brusttumorzelllinien eine Rolle spielen könnten, sofern diese korrekt in der Zytoplasmamembran eingebaut sind. Während bisher keine Daten über die Funktion von Claudin-3 als Tight Junction Komponente vorliegen und die Bedeutung von Occludin in Tight Junctions ebenfalls noch unklar ist, wurde zumindest für Claudin-4 gezeigt, daß eine Überexpression von Claudin-4 in MDCK Zellen zu einer selektiven Inhibition der parazellulären Permeabilität von

Na⁺-Ionen führt (93). Somit käme von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tight Junction assoziierten Proteinen in erster Linie Claudin-4 als funktionelle Komponente des Tight Junction Komplexes in Brusttumorzellen in Betracht.

In immunhistochemischen in vivo Studien zur Expression und Lokalisation von Claudin-1, -3 und -4 in soliden Tumoren finden sich jedoch weitere Hinweise für deren physiologische Rolle und Bedeutung in der Tumorgenese. So fand sich eine signifikant erhöhte Expression von Claudin-1 in Colonkarzinomen sowie von Claudin-3 und -4 in Prostata- und Ovarialkarzinomen (164-166). Es zeigte sich jedoch, daß die Claudin-1, -3 und -4 überexprimierenden Tumorgewebe jeweils eine unphysiologische, zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen. Zusätzlich wurde gezeigt, daß es in Ovarialkarzinomzellen bezüglich der Expression und des Homings von Claudin-3 und -4 keine Korrelation zur parazellulären Fluxänderung gibt (166). Gegenwärtig ist also noch nicht geklärt, ob und welche Rolle Claudin-3 und -4 bei der parazellulären Fluxsteuerung in Tumorzellen spielen. Desweiteren wurde in einer neueren Untersuchung eine reduzierte Expression von Claudin-7 in Brust- und Kopftumoren sowie von Claudin-23 in Magenkarzinomen festgestellt (161-163). Phänotypisch bedeutet sowohl der Verlust der Expression als auch der Membranlokalisation von Claudin-Molekülen eine potentielle Verbesserung des parazellulären Fluxes. Diese Hypothese wurde jedoch bei den oben genannten Claudinen, außer Claudin-1, bisher noch nicht in vitro durch parazelluläre Fluxstudien belegt. In diesem Zusammenhang ist desweiteren noch bedeutsam, daß die Überexpression einzelner Claudine mit nur geringem Membranhoming das exakte Mischungsverhältnis der am Aufbau von Tight Junction Strukturen beteiligter Claudine stören und somit zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität führen könnte. Damit würde sowohl die reduzierte als auch die vermehrte Expression von Claudinen einen Verlust der Tight Junction Barrierefunktion zur Folge haben. Diese Hypothese eines dominant negativen Effekts der Überexpression von Claudinen wird durch die Beobachtungen gestützt, daß einerseits die Überexpression von Claudin-2 in MDCK Zellen zu einer reduzierten Abdichtung des Interzellularraumes und andererseits die erhöhte Expression von Claudin-3 und -4 in Ovarialkarzinomzelllinien zumindest nicht zur Ausbildung funktioneller Tight Junctions führt (91, 165).

Schließlich wurde der Expressionsstatus der intrazellulären Tight Junction assoziierten Proteine ZO-1 und ZO-2 untersucht. Da nahezu alle untersuchten Zelllinien unabhängig von der Höhe der parazellulären Diffusionsbarriere unterschiedliche Mengen der Zonula Occludens Proteine ZO-1 und ZO-2 exprimierten, ist auszuschließen, daß ZO-Proteine einen direkten Einfluß auf die Tight Junction Barrierefunktion in Brusttumorzellen haben.

In einer Reihe von Studien an soliden Tumoren wurde der Expressions- oder Funktionsverlust von Tight Junctions nachgewiesen (150-155). Auf der Basis dieser Befunde wurde von James Mullin die Hypothese entwickelt, daß die Öffnung parazellulärer Räume zu einem Abbau von Konzentrationsgradienten für Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Stoffwechselendprodukten führt und damit einen verbesserten Stoffaustausch in Tumoren ermöglichen könnte (148, 149). Abgesehen von histologischen Befunden und phänotypischen Molekülfluxstudien an Zellmonolayern lagen bisher keine hinreichenden funktionellen Untersuchungen in mehrschichtigen Tumorgeweben oder Zellaggregaten vor, welche diese Hypothese experimentell belegen würden. Um das von Mullin postulierte Konzept im Tumorgeneseprozess zu untersuchen, wurde der Einfluß von Claudin-1 in MDA-MB 361 Zellen in vitro in Sphäroidkulturen und in vivo im Maus Xenograftmodell auf Zellwachstum und Zelltod analysiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression von Claudin-1 weder in subkonfluenten noch in konfluenten 2D Monolayerkulturen einen signifikanten Einfluss auf die Zellmorphologie sowie die Proliferations- und Zelltodrate in MDA-MB 361 Zellen hat (Abb.9). In 3D Sphäroidkulturen zeigte sich, daß Claudin-1 positive MDA-MB 361 Tumorsphäroide eine deutlich kompaktere 3D Morphologie mit einer dichteren Zellpackung im Vergleich zu Claudin-1 negativen Sphäroiden entwickelten (Abb.11). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Ausbildung von Tight Junctions durch Polymerisierung von Claudin-1 Molekülen in der Zellmembran möglicherweise auch zu einer verbesserten Zell-Zelladhäsion beitragen könnte. Studien von Kubota et al, in denen die Reaggregationskinetik Claudin-1 transfizierter Maus L Fibroblasten nach Vereinzelung mit Trypsin gemessen wurde, zeigten ebenfalls, daß Claudin-1 an einer schwachen, Ca^{2+} -Ionen unabhängigen, wenn auch schwachen Zell-Zelladhäsion beteiligt ist (195). Ein besonderer Befund der vorliegenden Arbeit ist, daß sich Claudin-1 positive und negative Tumorsphäroide weder signifikant in ihrer finalen Größe noch bezüglich der Zellproliferationsraten unterschieden. Jedoch wurde unabhängig von der Sphäroidgröße eine signifikant erhöhte Zahl toter Zellen in zentralen Sphäroidbereichen verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate in Claudin-1 positiven Sphäroiden detektiert (Abb.11 und Abb.12). Auffällig war desweiteren, daß die Apoptoseinduktion in Claudin-1 positiven Tumorsphäroiden nicht mit der Expressionshöhe sondern mit der Qualität der Membranlokalisation von Claudin-1 korreliert. So entsprach der Anteil apoptotischer Zellen in Klon 2 Sphäroiden mit vorwiegend zytoplasmatischer Claudin-1 Lokalisation in etwa dem Anteil in Claudin-1 negativen Sphäroiden, während Klon 6 Sphäroide mit Membranlokalisation von Claudin-1 eine deutlich erhöhte Apoptoserate zeigten. Aus diesem Befund läßt sich schließen, daß neben einem Verlust der Claudin-1 Expression dem Verlust des Membranhomings von Claudin-1 die entscheidende Bedeutung für den Funktionsverlust von

Tight Junctions in Tumoren zukommt. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese von Mullin der Limitation der Nährstoffversorgung durch Tight Junction Expression in Tumorgeweben (149), und könnte auch die scheinbar widersprüchlichen Daten in Colonkarzinomen erklären. Dort wurde zwar einerseits eine Überexpression von Claudin-1 Protein nachgewiesen, andererseits zeigten die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Claudin-1 eine teilweise membranständige sowie eine diffus zytoplasmatische Claudin-1 Färbung in den Colonkarzinomzellen (164).

In Claudin-1 negativen und positiven Sphäroiden unterschiedlicher Größe zeigte sich weiterhin, daß der Volumenanteil toter Zellen in zentralen Sphäroidbereichen unabhängig von der Sphäroidgröße in Claudin-1 positiven Sphäroiden immer größer war und proportional mit der Sphäroidgröße zunahm (Abb.11). Diese Beobachtung schließt die Möglichkeit aus, daß der vermehrte Zelltod in Claudin-1 positiven Sphäroiden lediglich durch die Ausbildung größerer Sphäroide im Vergleich zu Claudin-1 negativen Sphäroiden hervorgerufen wurde. Die erhöhte Zelltodrate in zentralen Sphäroidbereichen war bereits ab einer Sphäroidgröße von $1 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ evident, was etwa einem Sphäroiddurchmesser von $200 \mu\text{m}$ oder ca. 15-20 x dem Zelldurchmesser von MDA-MB 361 Zellen entsprach. Berechnungen der absoluten Anteile lebender und toter Zellen in den Sphäroiden ergaben, daß in Claudin-1 positiven Sphäroiden bereits ab einer Schichtdicke von 5 bis 6 Zelldurchmesser eine limitierte Diffusion von Stoffen über parazelluläre Räume stattfindet bzw. der Stoffaustausch über transzytotische Prozesse nicht mehr ausreicht, um eine Versorgung von Zellen im Inneren der Sphäroide zu gewährleisten. Studien, in denen die Bedeutung der Neovaskularisierung für das Tumorstadium untersucht wurde ergaben, daß Tumore in vivo nicht über eine Größe von 1 mm^3 hinauswachsen können, sofern keine Gefäßversorgung erfolgt (19-21). Diese Ergebnisse zusammen mit der Beobachtung einer Apoptoseinduktion in Claudin-1 positiven Sphäroiden deuten darauf hin, daß die Aufrechterhaltung einer Tight Junction Barrierefunktion zu einer limitierten Stoffdiffusion in sich entwickelnden avaskulären Mikrotumoren führen und ein Tumorstadium über eine kritische Größe hinaus verhindern könnte.

In den Sphäroidstudien stellt sich desweiteren die Frage nach einer möglichen Induktion von Claudin-1 abhängigen Apoptosesignalwegen. Da die Claudin-1 Expression weder in konfluenten 2D Monolayerkulturen noch in peripheren Bereichen der Tumorsphäroide zu einer erhöhten Absterberate führte, sondern der vermehrte Zelltod ausschließlich auf die zentralen Sphäroidbereiche beschränkt war, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß die Reexpression von Claudin-1 direkt zu einer Aktivierung apoptotischer Signalwege führt.

Da der Prozess der Neovaskularisierung von Mikrotumoren in vivo einen entscheidenden Faktor für das progressive Wachstum von Tumoren darstellt, ergab sich nachfolgend die Fragestellung,

ob die Reexpression von Claudin-1 in MDA-MB 361 Zellen auch in vaskularisierten Tumoren zu einem verringerten Tumorwachstum aufgrund einer erhöhten Zelltodrate der Tumorzellen führt. Aus diesem Grunde wurde ein Tierversuch mit SCID-Mäusen an MDA-MB 361 Zellen als Xenograftmodell durchgeführt. Um dabei den Effekt der unterschiedlichen Claudin-1 Membranlokalisation zu untersuchen, wurden bei diesem Versuch mit jeweils 25 Tieren pro Gruppe Claudin-1 negative Zellen (Gruppe 1), Claudin-1 positive Zellen Klon 2 mit vorwiegend cytoplasmatischer Lokalisation (Gruppe 2) sowie Claudin-1 positive Zellen Klon 6 mit membranständiger Lokalisation (Gruppe 3) untersucht. Die Wachstumskinetik der Xenografttumore und die Überlebensrate der Mäuse bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums innerhalb des Versuchszeitraums von 56 Tagen zeigten tatsächlich, daß Mäuse der Gruppe 3 ein signifikant reduziertes Tumorwachstum gegenüber den beiden anderen Gruppen um ca. 60 % nach 28 Tagen aufwiesen sowie deutlich länger überlebten als die Versuchstiere von Gruppe 1 und 2 (Abb.14 und Abb.15). Die Analyse der verschiedenen Xenografttumore Klon 2 und Klon 6 ergab zum einen, daß das in vivo Wachstum von MDA-MB 361 Zellen keinen Einfluß auf die Expression sowie das Lokalisationsmuster von Claudin-1 hatte, und zum anderen, daß das verringerte Tumorwachstum von Gruppe 3 Tumoren mit einer signifikant erhöhten Apoptose- und Zelltodrate der Tumorzellen korrelierte (Abb.16, Abb.18 und Abb.20). Das Ergebnis, daß Claudin-1 positive Xenografttumore der Gruppe 2 und Claudin-1 negative Xenografttumore der Gruppe 1 sich weder in der Wachstumskinetik noch in ihrem relativen Anteil toter/apoptotischer Zellen unterschieden, bestätigte die in vitro Befunde einer notwendigen Membranlokalisation von Claudin-1 für die Claudin-1 abhängige Zelltodinduktion in Tumoren.

Die Bestimmung des relativen Stromaanteils sowie der Gefäßdichte ergab keine signifikanten Unterschiede in den Xenografttumoren aller 3 Gruppen (Abb.21 und Abb.22). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Expression und Membranlokalisation von Claudin-1 in in vivo Tumoren scheinbar die Sekretion von Angiogenesefaktoren sowie den Angiogeneseprozess nicht beeinflussen. Dies könnte sich damit begründen lassen, daß für die Migration von Endothelzellen ein angiogener Stimulus durch gefäßnahe Tumorzellen offensichtlich ausreichend ist. In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmalig gezeigt, daß im Hinblick auf das reduzierte Tumorwachstum und die erhöhte Apoptoserate in Tumoren mit membranständiger Claudin-1 Expression diese unabhängig von der Vaskularisierung des Tumors offensichtlich die Diffusion zwischen gefäßperipheren Tumorzellen und dem Kapillarsystem limitiert und dadurch eine Mangelversorgungssituation der Zellen herbeiführt.

Trotz eines reduzierten Tumorwachstums und einer deutlich erhöhten Zelltodrate konnte gleichzeitig eine geringfügige, aber signifikant erhöhte Zellproliferationsrate in den Xenografttumoren

der Gruppe 3 nachgewiesen werden (Abb.19). Da das Nettowachstum dieser Tumore im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen stark verlangsamt war, muß also eine deutliche Überkompensation der leicht erhöhten Proliferationsrate durch eine größere Absterberate der Tumorzellen angenommen werden. Eine Erklärung für diesen auf den ersten Blick paradoxen Befund könnte sein, daß die durch die Abdichtung parazellulärer Räume hervorgerufene Mangelversorgung zu einem vermehrten Absterben der Tumorzellen in Mikroarealen des Tumors und damit zu einer Öffnung der Interzellulärräume führt. Dies würde kurzfristig für einen besseren Stoffaustausch sorgen und nachfolgend eine höhere Proliferationsrate in diesem Mikrobereich des Tumors zur Folge haben. Durch das vermehrte Wachstum würden sich wiederum neue Diffusionsgradienten aufbauen, die eine erneute Mangelversorgung verbunden mit einem vermehrten Absterben der Tumorzellen bewirken könnte.

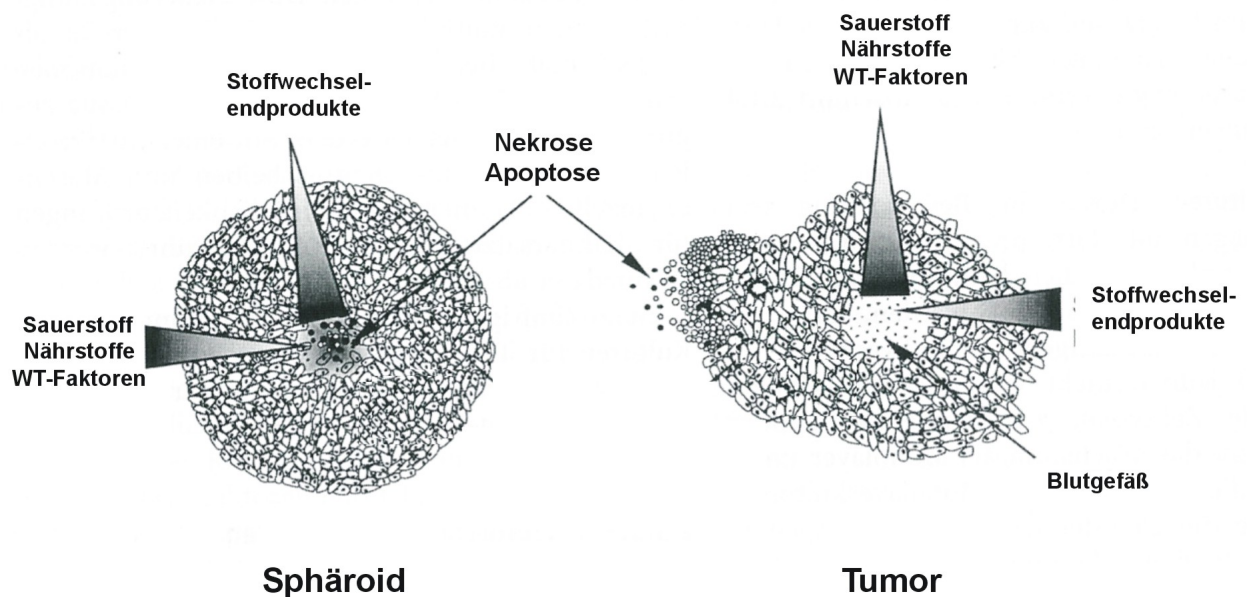


Abb.40: Schematische Darstellung der Stoffgradienten in Tumorsphäroiden und soliden Tumoren (nach Müller-Klieser 2000)

Die Ergebnisse der Tumorsphäroide und Xenografttumore lassen sich folgendermaßen veranschaulichen (Abb.40): In Tumorsphäroiden und soliden Tumoren bestehen entgegengesetzte Konzentrationsgradienten von Sauerstoff, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Stoffwechselendprodukten. So finden sich in in vivo Tumoren hohe Konzentrationen von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff sowie niedrige Konzentrationen von Stoffwechselendprodukten in gefäßnahen Bereichen, da kurze Diffusionsdistanzen vom Blutgefäß zu den Zellen einen guten Stoffaustausch ermöglichen. Umgekehrt weisen multizelluläre Sphäroide hohe Nährstoff-,

Wachstumsfaktor- und Sauerstoffkonzentrationen sowie niedrige Konzentrationen von Stoffwechselprodukten in peripheren Arealen auf, da dort ein guter Stoffaustausch mit dem umgebenden Medium möglich ist. In diesen Bereichen können jeweils hohe Zellproliferationsraten nachgewiesen werden (196-198). In zentralen Sphäroidbereichen bzw. gefäßperipheren Arealen von in vivo Tumoren finden sich dagegen niedrige Proliferationsraten sowie eine erhöhte Absterberate der Tumorzellen durch Mangelversorgung mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff sowie Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte mit einer lokalen Abnahme des pH-Werts. Die durchgeführten Studien zur Claudin-1 Reexpression in Tumorsphäroiden und Xenografttumoren ergab in Abhängigkeit der Membranlokalisation von Claudin-1 eine erhöhte Apoptoserate in zentralen Sphäroidbereichen sowie eine erhöhte Zelltodrate in Xenografttumoren, die zu einem verringerten Tumorwachstum führte. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassend schließen, daß der Verlust der Expression und/oder Membranlokalisation von Claudin-1 einen weiteren wichtigen Schritt in der Tumorprogression darstellt. Desweiteren untermauern die vorliegenden Daten die Hypothese, daß durch die Öffnung parazellulärer Räume eine bessere Versorgung gefäßperipherer Tumorzellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ermöglicht wird und dies zu einem besseren Tumorwachstum führt (148, 149). Somit wäre eine Induktion der Reexpression und die richtige Membranlokalisation von Claudin-1 in Karzinomen von hoher therapeutischer Relevanz.

Obwohl diverse Signalwege mit der Steuerung der Expression und Membranlokalisation von Claudinen in Zusammenhang gebracht wurden, liegen bislang nur wenige konkrete Daten für die Regulation von Claudin-1 vor. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Behandlung mit nukleären Hormonrezeptoragonisten wie Retinoide oder Steroide (119, 123, 129, 130, 131), Wachstumsfaktoren und Zytokine (121, 134) oder Aktivatoren bzw. Inhibitoren cytosolischer Proteinkinasen wie PKC oder MEK-1 (114-116, 127) in phylo- und ontogenetisch unterschiedlichen Zellmodellen zu einer erhöhten Expression von Tight Junctions und Tight Junction assoziierter Moleküle führte. Da über die für Claudine relevanten Signalkaskaden in humanen Tumorzellmodellen so gut wie keine Informationen vorlagen, war es ein weiteres wichtiges Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, regulatorische Mechanismen zu identifizieren, die für den Expressionsverlust von Claudin-1 in der Brusttumorgenese verantwortlich sind. Die Untersuchung der Promotorregion sowie der Intron- und Exon-Bereiche des Claudin-1 Gens in 96 Patientinnen mit spontanen Brusttumoren, 93 Patientinnen mit Brusttumoren und familiärer Prädisposition sowie in 11 Brusttumorzelllinien ergab keine signifikanten Mutationen der Claudin-1 Gensequenz (167). Deshalb mußte eine Beteiligung epigenetischer Faktoren an der Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität des Claudin-1 Gens angenommen werden, wobei hier als Ursache

unter anderem die Methylierung des Claudin-1 Promotors, die fehlende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder eine Repression der Claudin-1 Genexpression durch dysregulierte Chromatinkondensation in Betracht kamen (3, 36, 37).

Die Methylierung von Cytosin-Resten in den Promotorbereichen betroffener Gene stellt einen häufigen epigenetischen „gene silencing“ Mechanismus in Tumorzellen dar (37). So wurde beispielsweise von Kominsky et al ein CpG reiche Region von -20 bis -900 bp stromaufwärts des Claudin-7 Gens in Brusttumorzellen identifiziert, welche z. B. in Claudin-7 negativen MDA-MB 231 und MDA-MB 435 Zellen hypermethyliert war und eine mRNA Reexpression nach 5-Azacytidin Behandlung zeigten (162). Bezüglich einer möglichen Promotormethylierung bei der Analyse des 5' UTR Bereiches des Claudin-1 Gens konnte ermittelt werden, daß zwischen -450 bis -500 stromaufwärts des Startcodons ein kurzer GC-reicher Sequenzabschnitt liegt, der die Kriterien einer möglichen CpG Insel erfüllt. Die Tatsache aber, daß die durch Hypermethylierung des Promotors stillgelegten Gene in der Regel multiple CpG Inseln im 5' UTR Bereich aufweisen, macht diesen Mechanismus für die Regulation von Claudin-1 in der Brusttumorgenese unwahrscheinlich (37). Desweiteren konnte in fünf von acht untersuchten Brusttumorzelllinien noch eine, wenn auch geringe endogene Expression von Claudin-1 mRNA detektiert werden (Abb.1). Um zu untersuchen, ob eine Promotormethylierung des Claudin-1 Gens für den Verlust der Claudin-1 Expression verantwortlich ist, wurden die Brusttumorzelllinien MDA-MB 361 und MDA-MB 435, in denen weder eine Claudin-1 mRNA noch Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin behandelt. Diese Studie führte zu dem Ergebnis, daß bei keiner der untersuchten Konzentrationen und Inkubationszeiten der 5-Azacytidin Exposition eine Induktion der Claudin-1 Genexpression in den beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Abb.28). Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, daß eine Methylierung des Claudin-1 Promotors für den Verlust der Claudin-1 Expression in der Brusttumorgenese eher unwahrscheinlich ist.

Wie bereits zu Beginn angedeutet, wurden verschiedene Signaltransduktionswege mit der Regulation von Expression und Lokalisation Tight Junction assoziierter Moleküle in Verbindung gebracht. Darunter fallen einerseits an extrazelluläre Rezeptoren gekoppelte intrazelluläre Signalwege, an denen heterotrimere G-Proteine, kleine GTP-bindende Proteine (Ras, RhoA, Rac1), Proteinkinasen (PKA, PKC, MEK-1, Raf-1) sowie second messenger Moleküle (Ca^{2+} , cAMP) beteiligt sind und andererseits intrazelluläre, nukleäre Hormonrezeptoren wie Retinoid- und Steroidrezeptoren (113-127). Zusätzlich deuten mehrere Studien auf die Bedeutung des Ras-MEK-ERK Signalweges für die Steuerung der Expression und des korrekten Membranhoming von Tight Junction Molekülen hin. So konnte gezeigt werden, daß Ha-Ras transformierte

MDCK-Zellen ein unphysiologisches zelluläres Homing von Claudin-1, Occludin und ZO-1 im Cytoplasma aufweisen. Nach Inhibition des MAPK-Signalweges mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 wurde eine Relokalisation aller drei Proteine an die Zytoplasmamembran verbunden mit der Ausbildung funktioneller Tight Junctions beobachtet (127). In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde von Li et al. nach Expression einer onkogenen Form des Ras-Effektors Raf-1 in Pa-4 Zellen neben einer Verringerung der Claudin-1 und Occludin Proteinmenge und einer zytoplasmatischen Lokalisation von ZO-1 auch ein Verlust der Tight Junction Diffusionsbarriere berichtet (132). Im Gegensatz hierzu zeigten jedoch Kinugasa et al. an Interleukin-17 behandelten T84 Epithelzellen, daß die Inhibition des MAPK Signalwegs die Entwicklung funktioneller Tight Junctions blockierte und zu einer verminderten Expression von Claudin-2, aber nicht von Claudin-1 führte (133). Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise damit erklären, daß sich die untersuchten Zellmodelle in ihrer phylo- und ontogenetischen Herkunft voneinander unterscheiden oder möglicherweise eine unphysiologisch hohe Überexpression von Ras bzw. Raf-1 zu Artefakten führte. Da die konstitutive Aktivierung oder Überexpression von Ras oder von Ras-Effektoren in in vivo Tumoren häufig mit dem Verlust der epithelialen Differenzierung und Tumorwachstum korreliert, war es aber naheliegend anzunehmen, daß der Ras-MEK-ERK Signalweg neben einer Fehlsteuerung von Zellproliferation und Apoptose möglicherweise auch an zu einer Dysregulation der Tight Junction Funktion in Brusttumorzellen beteiligt ist (135).

Für die Untersuchung der Bedeutung des Ras-Signalwegs für die Regulation von Claudin-1 in Brusttumorzellen wurden deshalb zwei Brusttumorzellmodelle gewählt, die sich in ihrem Ras-Aktivierungsstatus unterschieden. In MCF-7 Zellen mit einem hohen zellulären Ras-GTP Gehalt konnte auch eine höhere Expression von Ras-Gesamtprotein nachgewiesen werden, im Gegensatz zu T47-D Zellen mit einer eher niedrigen Ras-Aktivität (Abb.23) (176). Die Behandlung beider Zelllinien mit dem selektiven MEK-1 Inhibitor PD98059 führte zu einer massiven Abnahme der phosphorylierten Form von ERK1/2 (Abb.24). Die vollständige Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 bei effektiven PD98059 Konzentration resultierte jedoch in keiner der beiden Zellmodelle in einer quantitativen Änderung der mRNA- und Proteinexpression von Claudin-1 sowie anderer Tight Junction assoziierter Proteine wie Occludin und ZO-1 (Abb. 24, 25; Tabelle 1). Auch in MDA-MB 231 Brusttumorzellen, die ebenfalls eine erhöhten zellulären Ras-GTP Gehalt und eine niedrige endogene Expression von Claudin-1 aufweisen, konnte keine Expressionsänderung von Claudin-1 nach MEK-1 Inhibition festgestellt werden. Diese Befunde werden durch die Daten von Chen et al. an MDCK Hundezellen unterstützt, in denen nach MEK-1 Inhibition ebenfalls keine Änderung der Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1

festgestellt werden konnte (127). Aufgrund der im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse scheint es eher unwahrscheinlich, daß die Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen durch den Ras-MEK-ERK Signalweg reguliert ist.

Die Untersuchungen von Chen et al. hatten gezeigt, daß in Ras-transformierten MDCK Zellen eine unphysiologische Claudin-1 Lokalisation im Cytoplasma vorlag und nach Behandlung mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 zwar keine Expressionsänderung, aber eine Relokalisation von Claudin-1 an die Zytoplasmamembran stattfand (127). Um den Einfluß einer unterschiedlichen Ras-Aktivität auf das zelluläre Homing von Claudin-1 in Brusttumorzellen zu untersuchen, wurde Claudin-1 durch retrovirale Transduktion in MCF-7 Zellen überexprimiert. Dabei wurden zwei Claudin-1 positive MCF-7 Tochterzellklone selektioniert, die beide neben einer hohen Ras-Aktivität eine membranständige Expression als auch eine signifikante zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-1 aufwiesen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Chen et al. konnten nach MEK-1 Inhibition mit PD98059 jedoch sowohl in T47-D Zellen als auch in den Claudin-1 transduzierten MCF-7 Zellklonen keine signifikanten Änderungen der subzellulären Lokalisation von Claudin-1 gefunden werden (Abb.26, 127). Auch die Untersuchung der parazellulären Ionen- und Molekülpermeabilität nach MEK-1 Inhibition in konfluenten T47-D und Claudin-1 transduzierten MCF-7 Zellmonolayern ergab keine Änderungen der parazellulären Diffusionsbarriere (Abb.27). Da in diesem funktionellen Test Änderungen aller an der Barrierefunktion von Tight Junctions beteiligten Proteine evident werden, scheint es offensichtlich weder eine Beteiligung des Ras-MEK-ERK Signalweg an der Regulation der Homings oder der Expression von Claudin-1, Occludin und ZO-1 noch anderer potentieller Komponenten des Tight Junction Komplexes in Brusttumorzellen zu geben.

In mehreren Studien wurde beschrieben, daß sich eine veränderte Tight Junction Funktion und Expression Tight Junction assoziierter Moleküle nach artifizieller Aktivierung von Transkriptionsfaktoren findet. So konnte gezeigt werden, daß die Expression von Tight Junction Proteinen sowie die transepitheliale Diffusionsbarriere in murinen F9 embryonalen Karzinomzellen und humanen zervikalen Epithelzellen durch Stimulation von Retinoid-Rezeptoren mit natürlichen Retinoiden wie all-trans Retinsäure (t-RA) reguliert wird (129, 131). Retinoide sind an der Zelldifferenzierung in verschiedenen epithelialen Gewebeverbänden beteiligt und vermitteln ihre Wirkung als Liganden nukleärer Transkriptionsfaktoren, die als Retinsäure-Rezeptoren (*Retinoic Acid Receptors*, RAR) und Retinoid X Rezeptoren (*Retinoid X Receptors*, RXR) bezeichnet werden und zelltypabhängig jeweils in drei Unterformen (α , β , γ) vorkommen (128). Publierte Expressionsdaten von Retinoid-Rezeptoren in verschiedenen Brusttumorzelllinien zeigen, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellmodelle ohne oder mit nur geringer

Claudin-1 Expression nahezu alle der bisher analysierten Retinoid-Rezeptor Subtypen exprimieren, so daß eine fehlende Retinoid-Rezeptor Expression für den Expressionsverlust von Claudin-1 sehr wahrscheinlich keine Rolle spielt (Tabelle 2, 177-183). Andererseits könnte aber eine Expressions-verringerung von Claudin-1 auch durch eine fehlende oder zu geringe Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren verursacht sein. Um die Bedeutung des Retinoid-Rezeptorsignalwegs für die Regulation von Claudin-1 Expression in der Brusttumorgenese umfassend zu verstehen, wurde der Effekt von Retinoidsubstanzen bekannter Wirkspezifität in acht unterschiedlich dedifferenzierten Brusttumorzelllinien analysiert (172).

Die Analyse der Claudin-1 Genexpression nach Behandlung mit RAR-Panagonisten und selektiven RAR- α , - β und - γ Agonisten/Antagonisten ergab, daß von allen acht untersuchten Brusttumorzelllinien nur MCF-7 Zellen mit einer Zunahme der Claudin-1 mRNA-Genexpression reagierten (Abb.29 und Abb.30). Allerdings führte der Zuwachs der Claudin-1 Expression maximal zu einem Expressionsniveau von etwa 10 % im Vergleich der endogenen Claudin-1 Expression in T47-D bzw. HMEC Zellen. Dabei konnte die höchste Induktion der Claudin-1 mRNA Expression nach Inkubation mit RAR Panagonisten und selektiven RAR- α bzw. RAR- β Agonisten erreicht werden. Diese Ergebnisse lassen mehrere Schlußfolgerungen zu: Erstens ergab die Sequenz-analyse des Claudin-1 Gens kein Retinsäure-Responsivelement (RARE) in promotor-nahen Sequenzbereichen, was darauf hindeutet, daß die Induktion der Claudin-1 Expression nach Retinoid-Rezeptor Stimulation wahrscheinlich indirekt durch Aktivierung oder aber auch durch Inaktivierung anderer, die Claudin-1 Genaktivierung steuernder Faktoren hervorgerufen werden könnte (128). Zweitens ist es aufgrund der nur geringen Zunahme der Claudin-1 Expression in MCF-7 Zellen wahrscheinlich, daß neben der fehlenden Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren weitere Signalwege für die Downregulation der Claudin-1 Expression bedeutsam sind. Letztere Vermutung wird durch den Befund gestützt, daß alle anderen Brusttumorzelllinien ohne sowie mit geringer Expression von Claudin-1 nicht mit einer Zunahme der Claudin-1 Expression nach Retinoidgabe reagierten, obwohl die RAR/RXR Rezeptoren vorhanden sind (Abb.30, Tab.2).

Diese Mehrschrittsthese der Claudin-1 Expressionsregulation in den charakterisierten Zellmodellen ist in Abb.41 anhand der Claudin-1 Expression und Responsivität gegenüber Retinoiden in Form eines Stammbaum dargestellt. So könnte im Zuge der Brusttumorgenese ein erster Defekt zu einer verringerten endogenen Aktivität des Retinoid-Rezeptor Signalwegs führen, die eine Abnahme der Claudin-1 Expression zur Folge hätte. In weiteren nachfolgenden Schritten des Tumorgeneseprozesses kommen zusätzliche Fehlregulationen hinzu, die letztlich zu einer kompletten Inaktivierung des Retinoid-Rezeptor Signalwegs und schließlich zum vollständigen Expressionsverlust von Claudin-1 führen.

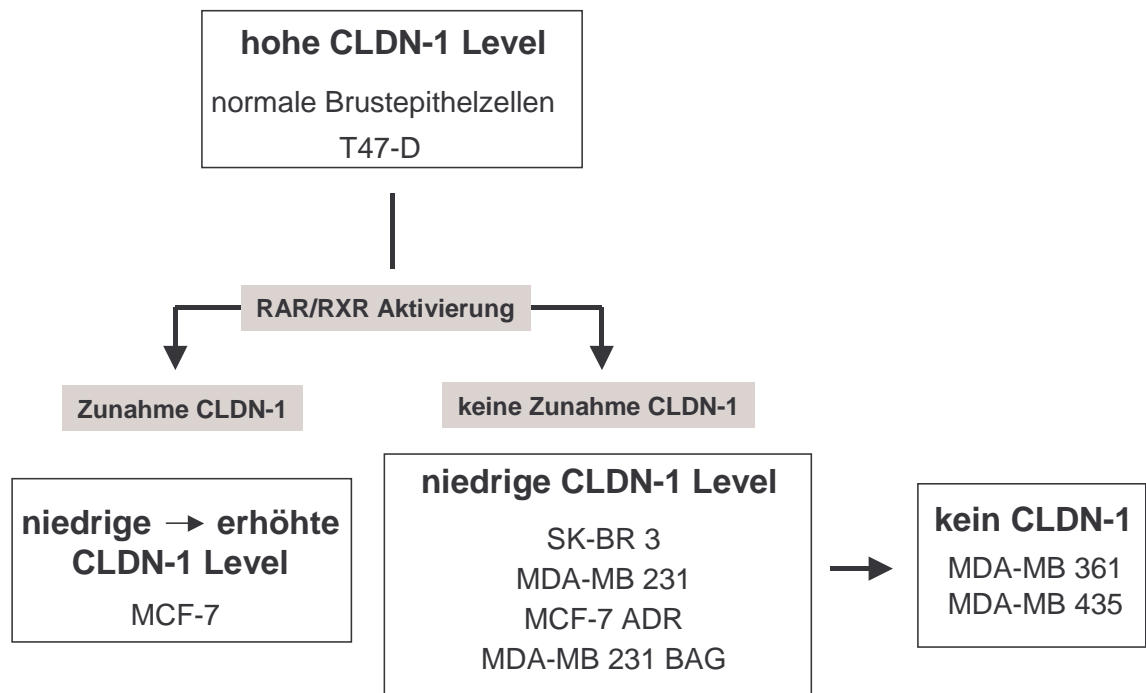


Abb.41: Hypothetischer Stammbaum von Brusttumorzelllinien bezüglich ihres Claudin-1 Expressionsstatus und Responsivität gegenüber Retinoid-Substanzen.

Die Untersuchungen zur Rolle des Retinoid-Rezeptor Signalwegs in der Regulation des Claudin-1 Gens in Brusttumorzellen deutete darauf hin, daß aufgrund der fehlenden Responsivität in den meisten Tumormodellen weitere multiple Defekte an der Downregulation der Claudin-1 Expression in der Brusttumorgenese beteiligt sein müssen. Ein häufig in Tumorzellen deregulierter Mechanismus ist die Transkriptionskontrolle mittels Kondensation des Chromatins durch Anlagerung von Histon-Proteinen an bestimmte DNA-Bereiche (36, 185). Die Chromatin-konfiguration wird dabei durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) und -Deacetylasen (HDACs) gesteuert: Histon-Acetylierung führt zur Chromatinauflockerung und nachfolgender Genaktivierung, Histon-Deacetylierung bewirkt hingegen eine Kondensation des Chromatins mit einer Verringerung der Transkriptionsaktivität des in dem betroffenen DNA-Abschnitt gelegenen Gens. Sowohl von HATs als auch von HDACs existieren verschiedene Isoformen, die regulatorische Komplexe mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, u.a. mit Retinoid-Rezeptoren bilden. In Tumoren konnte neben der Inaktivierung von HAT Enzymen vor allem eine Überexpression von HDAC Enzymen nachgewiesen werden (199-201). So wäre vorstellbar, daß eine erhöhte HDAC Aktivität in Brusttumoren zu einer verringerten transkriptionellen Aktivität des Claudin-1 Gens führen könnte.

Um eine mögliche Beteiligung dieses Mechanismus an der Repression des Claudin-1 Gens in Brusttumorzellen zu analysieren, wurde der alleinige Effekt potenter HDAC Inhibitoren als

pleiotrop wirksame Aktivatoren der Gentranskription auf die Expression von Claudin-1 sowie in Kombination mit Retinoidssubstanzen analysiert. Für diese Studien wurden vier HDAC Inhibitoren gewählt, die sich in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden. Während SAHA, TSA und MS-275 direkt die Aktivität von Histondeacetylasen blockieren, beeinflusst CI-994 den Acetylierungsstatus des Chromatins indirekt durch einen bisher noch unbekannten Mechanismus (36, 186).

Die Untersuchung der Genexpression von Claudin-1 nach HDAC-Inhibition ergab einen Zuwachs der Claudin-1 mRNA Menge in sechs von acht untersuchten Brusttumorzelllinien (Abb.31). Nach Behandlung mit SAHA und CI-994 zeigte sich durchschnittlich die höchste Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression, die in dedifferenzierten MDA-MB 231 BAG Zellen mit einem Zuwachs von etwa 0.5 % auf 10 % bzw. 30 % im Vergleich zum Expressionsniveau unbehandelter T47-D Zellen am höchsten ausfiel. Die Analyse der Claudin-1 Proteinexpression nach HDAC Inhibition zeigte jedoch, daß der Zuwachs an mRNA und Protein, wie bereits nach Retinoidbehandlung von MCF-7 Zellen festgestellt (Abb.29, Abb.30), quantitativ nicht exakt miteinander korrelierten und auf Proteinebene geringer ausfiel. So war in T47-D Zellen mit hoher endogener Claudin-1 Expression eine weitere Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression nach HDAC Inhibitorbehandlung zu beobachten, die sich jedoch nicht in einer Zunahme der Claudin-1 Proteinexpression widerspiegelte. Ebenso war die Proteinzunahme in MDA-MB 231 BAG, MCF-7 ADR und MCF-7 Zellen geringer (Abb.32, Abb.33). Außerdem konnte beobachtet werden, daß die verschiedenen Substanzen eine unterschiedliche Wirkung auf die Claudin-1 mRNA und Proteinexpression in beiden Zellmodellen hatten. Obwohl z.B. SAHA wie CI-994 zu einer Zunahme der Claudin-1 mRNA Menge in MDA-MB 231 BAG führte, konnte in dieser Zelllinie nur nach CI-994 Behandlung auch eine deutliche Zunahme der Claudin-1 Proteinmenge festgestellt werden (Tabelle 4, Abb.33). Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, daß in Brusttumorzellen offensichtlich unterschiedliche Kontrollmechanismen für die Transkription und die Translation von Claudin-1 existieren, die durch die verwendeten pleiotrop wirksamen Substanzen unterschiedlich aktiviert werden. In Zusammenhang mit der beobachteten und zuvor beschriebenen posttranskriptionellen Regulation der Claudin-1 Proteinexpression in Abhängigkeit von Zell-Zellkontakten könnte sich dieses Ergebnis dadurch erklären lassen, daß sowohl Transkription, Translation als auch der Membrantransport des Claudin-1 Proteins unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegen.

Zusammenfassend kann aufgrund der Ergebnisse mit HDAC-Inhibitoren also festgestellt werden, daß im Gegensatz zur Retinoidrezeptoraktivierung der dysregulierten Chromatinkondensation eine allgemeine Bedeutung für die transkriptionellen Repression des Claudin-1 Gens in Brusttumorzellen zukommt. Es ist jedoch weiterhin denkbar, daß die Chromatindekondensation durch

HDAC Inhibition eine Voraussetzung für die bessere Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren zu Promotorregionen ist. Deshalb wurde überprüft, ob die gleichzeitige Dekondensation des Chromatins und Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren eine additive oder synergistische Wirkung auf die Claudin-1 Expression ausüben. Untersucht wurden hochdifferenzierte MCF-7 Zellen und niedrigdifferenzierte MDA-MB 231 BAG Zellen mit jeweils geringer endogener Claudin-1 Expression, die sowohl nach Retinoid- als auch nach HDAC Inhibitorgabe (MCF-7) oder nur nach HDAC Inhibitorbehandlung (MDA-MB 231 BAG) eine Zunahme der Claudin-1 Expression zeigten. In beiden Zellmodellen konnte nach Kombinationsgabe kein erhöhter Zuwachs der Claudin-1 Proteinmenge im Vergleich zur Einzelgabe von Retinoiden oder HDAC Inhibitoren detektiert werden (Abb.33). Im Gegenteil führte die Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzklassen jeweils sogar zu einer verringerten Zunahme der Claudin-1 mRNA Menge verglichen mit den Einzelbehandlungen (Tabelle 5). Dies deutet darauf hin, daß die aktivierten Retinoid-Rezeptoren nach Auflockerung der Chromatinstruktur offensichtlich über andere Signalwege indirekt als negative Regulatoren der Claudin-1 Expression wirken.

Die Untersuchung der Expression weiterer Tight Junction assoziierter Proteine wie Claudin-3, -4, Occludin und ZO-1 nach HDAC-Inhibitorbehandlung in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen ergab, daß hochdifferenzierte MCF-7 Zellen weder nach Einzelgabe von Retinoiden und HDAC Inhibitoren noch nach Kombinationsbehandlung eine Expressionsänderung von Claudin-3, -4, Occludin und ZO-1 zeigten (Abb.34). Lediglich niedrigdifferenzierte MDA-MB 231 BAG Zellen reagierten auf die CI-994 Behandlung mit einer signifikanten Zunahme der Claudin-3, -4 und Occludin Proteinexpression, während die mRNA Expression dieser Gene unverändert blieb. Da sich einerseits nach CI-994 Behandlung von MDA-MB 231 BAG Zellen die Proteinexpression von Claudin-1, Claudin-3, -4 und Occludin erhöhte, andererseits aber nur eine Zunahme der Claudin-1 mRNA Expression zu finden war, scheinen auch für die Expression von Claudin-3, -4 und Occludin posttranskriptionelle Kontrollmechanismen zu existieren.

Wie Untersuchungen des Ras-MEK-1 Signalwegs in MDCK-Hundezellen gezeigt hatten, kann die Aktivierung der an der Regulation von Tight Junction Molekülen beteiligten Signalwege neben der Expression auch die zelluläre Lokalisation von Tight Junction Proteinen beeinflussen (127). In unbehandelten MCF-7 Zellen konnte ein netzwerkartiges Muster der Membranlokalisation von Claudin-3, -4, Occludin und ZO-1 in allen Zellen detektiert werden, während nur einzelne wenige Zellen eine membranständige Claudin-1 Expression mit punktuierter zytoplasmatischer Färbung zeigten (Abb.36 und Abb.37). Die CI-994 Behandlung dieser Zelllinie ergab keine Änderung der bereits existierenden Membranlokalisation von Claudin-3, -4, Occludin und ZO-1. Allerdings nahm die Zahl der Claudin-1 positiver Zellen deutlich zu, wobei sich

inselförmige Zellcluster aus 3-8 Claudin-1 positiven Zellen bildeten, die eine Membranlokalisierung von Claudin-1 sowie eine vesikuläre zytoplasmatische Färbung aufwiesen. Dabei waren Claudin-1, Claudin-3, -4, Occludin sowie F-Aktin waren mit ZO-1 kolokalisiert (Abb.36-38). Diese Ergebnisse machen zum einen deutlich, daß die Dekondensation der Chromatinstruktur mit CI-994 offensichtlich nur in einer Subpopulation von MCF-7 Zellen zu einer Claudin-1 Expression führt und zeigen zum anderen, daß die am Membrantransport von Claudin-1 beteiligten Mechanismen, wie bereits bei der artifiziellen Überexpression von Claudin-1 in MDA-MB 361 und MCF-7 Zellen beobachtet (Abb.6 und Abb.26), noch intakt sein müssen. Unbehandelte MDA-MB 231 BAG Zellen wiesen hingegen eine unphysiologische zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-1, -4, Occludin und ZO-1 auf, wobei Claudin-3 ein ausgeprägtes nukleär-zytoplasmatisches Homing zeigte (Abb.36 und 37). Während MCF-7 Zellen nach CI-994 Behandlung keine signifikanten Änderungen der Zellmorphologie zeigten, nahm bei dedifferenzierten MDA-MB 231 BAG Zellen nach CI-994 Gabe die Zellgröße signifikant zu. Im Zuge dieser morphologischen Änderungen fand eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts mit einer Abnahme zytoplasmatischer Stressfasern und einer vermehrten Anordnung von Aktin-Mikrofilamenten im Zellkortex statt (Abb.38). Gleichzeitig mit der Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts konnte eine signifikante Relokalisation und Kolokalisation von Claudin-1, Occludin und ZO-1 vom Cytosol an Zell-Zellkontaktstellen detektiert werden, wobei jeweils noch eine zytoplasmatische Fluoreszenzfärbung von Claudin-1 und Occludin erkennbar war (Abb. 36-38). Diese Beobachtung ist im Einklang mit einer Reihe von Studien, in denen eine Kolokalisation und Bindung von ZO-1 mit F-Aktin, Claudinen und Occludin nachgewiesen werden konnte (101, 102, 127). Die nukleär-zytoplasmatische bzw. zytoplasmatische Lokalisation von Claudin-3 und Claudin-4 blieb durch Behandlung mit CI-994 allerdings unverändert (Abb.37). Dieses Ergebnis läßt schließen, daß die Auflockerung der Chromatinstruktur mit CI-994 in dedifferenzierten MDA-MB 231 BAG Brusttumorzellen Signalwege induziert, welche am Membrantransport von Claudin-1, Occludin und ZO-1, aber nicht von Claudin-3 und Claudin-4 beteiligt sind. Da in MCF-7 und MDA-MB 231 BAG Zellen die Expressionszunahme (Claudin-1) nur in einer Subpopulation von Zellen bzw. die vermehrte Membranlokalisierung primär punktuell und nicht in Form ununterbrochener Linienstrukturen der Membranfärbung nachweisbar war (Claudin-1 und Occludin), mag erklären, weshalb sich keine Zunahme der Tight Junction Diffusionsbarriere nach CI-994 Behandlung ergab (Abb.39).

Zusammenfassend deuten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit HDAC-Inhibitoren und Retinoidssubstanzen darauf hin, daß der Transkription, Translation und dem Membrantransport von Claudin-1 in Brusttumorzellen komplexe und

möglicherweise voneinander unabhängige Regulationsmechanismen zugrundeliegen. Dabei zeigte sich, daß zwar sowohl der Retinoid-Rezeptorsignalweg als auch die Chromatinstruktur für die Regulation der Claudin-1 Expression in Brusttumorzellen von Bedeutung ist, dennoch aber weitere Faktoren für den Expressionsverlust von Claudin-1 mit verantwortlich sein müssen. Die Expressionsstudien mit 5-Azacytidin ergaben keine Hinweise für die Beteiligung einer Methylierung der Claudin-1 Promotorsequenz. Um diesen Mechanismus für die Regulation von Claudin-1 in der Brusttumorgenese völlig auszuschließen, sollte jedoch geklärt werden, ob die im 5'UTR des Claudin-1 Gens identifizierte GC-reiche Sequenz methylierte CpG-Dinukleotide aufweist, wobei die Claudin-7 Promotorregion unter Verwendung der Bisulfitmethode (202) für einige der verwendeten Zelllinien sowohl als Positiv- als auch als Negativkontrolle dienen könnte (162).

Desweiteren enthält der Claudin-1 Promotorbereich eine Vielzahl theoretischer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem ein zwischen der murinen und humanen Claudin-1 Promotorsequenz hochkonserviertes GC-Box Sequenzmotiv, an das der ubiquitäre Transkriptionsfaktor SP1 spezifisch bindet. Es bleibt zu untersuchen, welche Rolle SP1 oder andere Transkriptionsfaktoren mit theoretischen Bindestellen im Claudin-1 Promotor für die Regulation der Claudin-1 Genexpression spielen. Dies sollte sich durch Überexpression dieser Faktoren in Brusttumorzelllinien sowie in Promotorstudien unter Verwendung eines Reportergensystems klären lassen (203).

Aufgrund vorliegender Literaturhinweise wurde die Bedeutung des Ras-Signaltransduktionswegs für die Expression und Lokalisation von Claudin-1 in Brusttumorzellen untersucht. Es konnten keine Hinweise gefunden werden, daß dieser Signalweg eine Rolle für die Regulation von Claudin-1 in Brusttumorzellen spielt. Deshalb sollte überprüft werden, ob andere Signalkaskaden am Expressionsverlust von Claudin-1 beteiligt sind. Hier käme in erster Linie der NF- κ B Signalweg in Betracht, welcher eine zentrale Rolle bei der Steuerung zellulärer Prozesse bei Gewebsentzündungen spielt (204). So konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von T84-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ) zu einer verringerten Expression und zytoplasmatischer Lokalisation von Occludin und ZO-Proteinen sowie zu einem Verlust der Tight Junction Funktion führt (205, 206). Außerdem konnte in Brusttumorzellen eine konstitutiv hohe Aktivität von NF- κ B nachgewiesen werden, die an einer Inaktivierung apoptotischer Signalwege beteiligt ist (207-209). Es wäre somit naheliegend, daß eine von extrazellulären Faktoren unabhängige, konstitutive Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade auch an der transkriptionellen Repression der Claudin-1 Gens in Brusttumorzellen beteiligt ist und dadurch zu einer verringerten

Absterberate von Tumorzellen aufgrund der verbesserten Stoffdiffusion in soliden Tumoren führt (Abb.40).

In Claudin-1 positiven Brusttumorzellen konnte nachgewiesen werden, daß die Expression von Claudin-1 Protein sowie der gerichtete Membrantransport posttranskriptionell in Abhängigkeit von etablierten Zell-Zellkontakte reguliert wird (Abb.2). Es wäre weiterhin zu klären, welche molekularen Mechanismen für die Steuerung dieses Prozesses verantwortlich sind. Dazu sollte die Möglichkeit einer Beteiligung membranständiger Zelladhäsionsmoleküle der Cadherin- oder Integrinfamilie an der Signalvermittlung des Zell-Zellkontakts untersucht werden. Bei dieser Untersuchung könnten neutralisierende oder inhibitorische Antikörper oder homologe Peptide gegen die extrazellulären Domänen dieser Zelladhäsionsmoleküle zum Einsatz kommen. Ob eine Interaktion zweier Claudin-1 Moleküle in sich kontaktierenden Zellen alleine reicht, um einen Einbau von Claudin-1 Molekülen in die Zellmembran nach einem Reißverschlussprinzip zu gewährleisten, könnte ebenfalls mit vorliegenden Antikörpern gegen beide extrazelluläre Domänen von Claudin-1 oder durch kompetitive Blockierung mit Claudin-1 Peptiden getestet werden. Für Occludin konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß Proteinfragmente der ersten extrazellulären Domäne für die Interaktion und stabile Membranlokalisation von Occludin an Zell-Zellkontakten notwendig sind (210).

Letztlich ergab die Analyse der Expression Tight Junction assoziierten Proteine ein heterogenes Expressionsmuster von Claudin-3 und -4 in den untersuchten Brusttumorzelllinien. Da über die Bedeutung von Claudin-3 und -4 für die parazelluläre Diffusionsbarriere so gut wie keine Daten vorliegen, sollte die Funktion dieser Moleküle als potentielle Tight Junction Moleküle in Brusttumorzellen überprüft werden. Für die funktionelle Charakterisierung bietet sich hierbei eine artifizielle Reexpression durch retroviralen Gentransfer in Claudin-3 und -4 negativen Brusttumorzelllinien (MDA-MB 361 bzw. MDA-MB 435, Abb.4) oder alternativ die Anwendung der siRNA-Technik an, um den Phänotyp eines genspezifischen knock-down dieser Proteine zu untersuchen (173, 211).

Abschließend sollte noch einmal hervorgehoben werden, daß es im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Brusttumormodellsystems erstmals gelang, die allgemeine zellphysiologische und klinische Bedeutung des Verlusts der Expression und Membranlokalisation des Tight Junction Moleküls Claudin-1 in der Tumorgenese aufzuklären. Die erzielten Ergebnissen lassen darauf schließen, daß der Verlust der epithelialen parazellulären Permeationskontrolle einen wichtigen Schritt in der Progression solider Tumore darstellt. Somit wäre die Blockierung der Stoffdiffusion in Tumoren durch Rekonstitution funktioneller Tight Junctions ein neuer Ansatz, das Wachstum solider Tumore zu hemmen und deshalb potentiell von hoher therapeutischer Relevanz.

6. Literaturverzeichnis

1. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol.* 1995;147:545-560.
2. Wolff L. Contribution of oncogenes and tumor suppressor genes to myeloid leukemia. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1332:67-104.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
4. Armitage P, Doll R. A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br J Cancer.* 1957;11:161-169.
5. Loeb LA. Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res.* 1998;72:25-56.
6. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23-28.
7. Cooper GM. Oncogenes as markers for early detection of cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16:131-136.
8. Hasketh R. *The Oncogene Handbook.* Academic Press, London, San Diego, New York 1994
9. Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science.* 1983;221:275-277.
10. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature.* 1994;372:143-149.
11. Kizaka-Kondoh S, Sato K, Tamura K, Nojima H, Okayama H. Raf-1 protein kinase is an integral component of the oncogenic signal cascade shared by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol.* 1992;12:5078-5086.
12. Masuda A, Kizaka-Kondoh S, Miwatani H, Terada Y, Nojima H, Okayama. Signal transduction cascade shared by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor is a major pathway for oncogenic transformation in NRK cells. *New Biol.* 1992;4:489-503.
13. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319:525-532.
14. Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med.* 1993;329:517-523.
15. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 1995;1:136-140.
16. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:820-823.
17. Lasko D, Cavenee W, Nordenskjold M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet.* 1991;25:281-314.

18. Zollinger H.U. Pathologische Anatomie. Thieme, Stuttgart, New York 1975
19. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst.* 1974;52:413-427.
20. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:4-6
21. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 1972;136:261-276
22. Thomlinson RH, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* 1955;9:539-549
23. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998;58:1408-1416.
24. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399:271-275.
25. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000;157:411-421.
26. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999;59:5830-5835.
27. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 2000;60:883-887.
28. Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene.* 2000;19:297-305.
29. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:38-47.
30. Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am.* 1996;275:150-154.
31. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):10931-10934. Review.
32. Gabrilovich D, Pisarev V. Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets.* 2003;4:525-536.
33. Wagener C. Molekulare Onkologie. Thieme, Stuttgart, New York 1999
34. Ahmad A, Hart IR. Mechanisms of metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1997;26:163-173.

35. Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett.* 1998;8:131-137.
36. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:94-202.
37. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet.* 2002;111:15-27.
38. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198:11-26.
39. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994;79:1157-1164.
40. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 1996;85:683-693.
41. Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis.* 1999;3:15-32.
42. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis *Cell Res.* 1998;8:171-177.
43. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996;84:345-357.
44. Balcarova-Stander J, Pfeiffer SE, Fuller SD, Simons K. Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *EMBO J.* 1984;3:2687-2694.
45. Nelson WJ, Veshnock PJ. Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol.* 1986;103:1751-1765.
46. Vega-Salas DE, Salas PJ, Gundersen D, Rodriguez-Boulan E. Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 1987;104:905-916.
47. Ojakian GK, Schwimmer R. The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 1988;107:77-87.
48. Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:161-177.
49. Mizejewski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222:124-138.

50. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:285-293.
51. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 1998;3:8-36
52. Yeager M, Unger VM, Falk MM. Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8:517-524.
53. Schafer S, Troyanovsky SM, Heid HW, Eshkind LG, Koch PJ, Franke WW. Cytoskeletal architecture and epithelial differentiation: molecular determinants of cell interaction and cytoskeletal filament anchorage. *C R Acad Sci III.* 1993;316:1316-1323.
54. Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem.* 1994;223:1019-1026.
55. Yap AS, Mullin JM, Stevenson BR. Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J Membr Biol.* 1998;163:159-167.
56. Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:554-560.
57. Troyanovsky SM. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:561-566.
58. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;1:628-633.
59. Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR, et al. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol.* 1993;21:481-483.
60. Schwarz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW. Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:461-491.
61. Volk T, Geiger B. A-CAM: a 135-kD receptor of intercellular adherens junctions. I. Immunoelectron microscopic localization and biochemical studies. *J Cell Biol.* 1986;103:1441-1450.
62. Boller K, Vestweber D, Kemler R. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 1985;100:327-332.
63. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* 1988;102:639-655.
64. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4246-4250.
65. Brakebusch C, Fassler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 2003;22:2324-2333.
66. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81:1-44.

67. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 1963;17:375-412.
68. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:225-236.
69. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 1998;141:1539-1550.
70. Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL. Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol.* 1999;36:1175-1188.
71. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3352-3356.
72. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15191-15196.
73. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000;113:2363-2374.
74. Furuse M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1993;123:1777-1788.
75. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 2000;11:4131-4142.
76. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998;141:397-408.
77. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:511-516.
78. Itoh, M et al. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 1999;147:1351-1367.
79. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem.* 2002;277:27501-27509.
80. Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2002;277:455-461.

81. Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic*. 2001;2:93-98.
82. Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, Gonzalez-Mariscal L. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int*. 2002;62:476-487.
83. Enck AH, Berger UV, Yu AS. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281:966-974.
84. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol*. 1999;147:185-194
85. Briehl MM, Miesfeld RL. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1381-1388.
86. Sonoda N. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol*. 1999;147:195-204 .
87. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. Claudin-11/OSP-based tight junctions in myelinated sheaths of oligodendrocytes and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol*. 1999;145:579-588
88. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003;3:147-156
89. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999;147:891-903.
90. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1998;143:391-401.
91. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonula occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into MDCK I cells. *J. Cell Biol*. 2001;153:263-272.
92. Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*. 2003;278:17350-17359.
93. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*. 2001;107:1319-1327.
94. Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur. J. Cell Biol*. 1999;78:849-855.
95. McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, Lynch RD, Schneeberger EE. Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci*. 2000;113:3387-98

96. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156:1099-1111.
97. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:531-536.
98. Simon, DB. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 1999;285,103-106.
99. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell.* 2001;104:165-172
100. Bezprozvanny I, Maximov A. PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:787-789
101. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127:1617-1626.
102. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem.* 1999;274:35179-185.
103. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.* 1998;141:199-208
104. Cordenonsi, M. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *Cell Biol.* 1999;147:1569-1582.
105. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139:785-795.
106. Ide N, Hata Y, Nishioka H, Hirao K, Yao I, Deguchi M, Mizoguchi A, Nishimori H, Tokino T, Nakamura Y, Takai Y. Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene.* 1999;18:7810-7815.
107. Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol.* 2001;154:491-497.
108. Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol.* 2002;157:161-172.

109. Marzesco AM, Dunia I, Pandjaitan R, Recouvreur M, Dauzonne D, Benedetti EL, Louvard D, Zahraoui A. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:1819-1831.
110. Sunshine C, Francis S, Kirk KL. Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells. *Exp Cell Res*. 2000;257:1-10.
111. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol*. 2001;152:1183-1196.
112. Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4233-4238.
113. Balda MS, Garrett MD, Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*. 2003;160:423-432.
114. Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H and Fuxe K. Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell TJs and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Molecular Neuroscience* 2000,11:1427-1431.
115. Mullin JM, Kampherstein JA, Laughlin KV, Saladik DT and Soler AP. Transepithelial paracellular flux leakiness induced by chronic phorbol ester exposure correlates with poly-like foci and redistribution of protein kinase C. *Carcinogenesis* 1997a, 18:2339-2345.
116. Mullin JM, Ginanni N, Laughlin KV. Protein kinase C activation increases transepithelial transport of biological active insulin. *Cancer Res*. 1998, 58:1641-1645.
117. Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2000, 20:57-76.
118. Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, Cereijido M and Anderson JM. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol*. 1993,123:293-302.
119. Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama GI, Mori M, Sawada N. Retinoid X receptor alpha and retinoid acid receptor gamma mediate expression of genes encoding TJ proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp. Cell Res*. 2001,263:163-172.
120. Porvaznik M, Johnson RG, Sheridan JD. TJ development between cultured hepatoma cells: possible stages in assembly and enhancement with dexamethasone. *J. Supramol. Struct*. 1979,10:13-30.
121. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X and Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000,118:1001-1011.

122. Duffy HS, John GR, Brosnan CF and Spray DC. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1-beta in primary human fetal astrocytes. *J. Neuroscience* 2000;20:1-6.
123. Woo PL, Cha HH, Singer KL and Firestone GL. Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor-beta in mouse mammary epithelial cells. *J. Biol Chem.* 1996;271:404-412
124. Gopalakrishnan S, Raman N, Atkinson SJ and Marrs JA. Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *Am. J. Physiol.* 1998, 275:798-809.
125. Jou TS, Schneeberger EE, Nelson WJ. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J. Cell Biol.* 1998, 142:101-115.
126. Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *PNAS* 1995, 92:10629-10633.
127. Chen YH, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA. Restoration of TJ structure and barrier function by downregulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Molec. Biol. Cell* 2000, 11:849-862.
128. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:181-193.
129. Gorodeski GI, Eckert RL, Pal D, Utian WH, Rorke EA. Retinoids regulate tight junctional resistance of cultured human cervical cells. *Am J Physiol.* 1997;273:C1707-713
130. Tobioka H, Sawada N, Zhong Y, Mori M. Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration. *Br J Cancer.* 1996;74:439-445
131. Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res.* 2001;263:163-172.
132. Li D, Murny RJ. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. *J. Cell Biol.* 2002;148:791-800.
133. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139:785-795.
134. Kinugasa T, Sakaguchi, T, Gu, X and Reinecker, HC, Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000, 118:1001-1011.
135. Marshall CJ, Ras effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996;8:197-204.

136. Murata T, Ishibashi T, Khalil A, Hata Y, Yoshikawa H, Inomata H. Vascular endothelial growth factor plays a role in hyperpermeability of diabetic retinal vessels. *Ophthalmic Res.* 1995;27:48-52.
137. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem.* 1999;274:23463-23467.
138. Schulzke JD, Fromm M, Rieken EO, Binder HJ. Epithelial transport and barrier pathomechanisms in gastrointestinal disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:1-375
139. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:216-228
140. Schmitz H, Barmeyer C, Gitter AH, Wullstein F, Bentzel CJ, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD. Epithelial barrier and transport function of the colon in ulcerative colitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:312-326.
141. Wu Z, Nybom P, Magnusson KE. Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000;2:11-17.
142. Kojima T, Fort A, Tao M, Yamamoto M, Spray DC. Gap junction expression and cell proliferation in differentiating cultures of Cx43 KO mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:1004-1113.
143. Rahner C, Stieger B, Landmann L. Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology.* 1996;110:1564-1578.
144. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15191-15196.
145. Pardridge WM. Introduction to the blood-brain barrier. Cambridge University Press, Cambridge 1998
146. Martin TA, Jiang WG. Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol Histopathol.* 2001;16:1183-1195.
147. Mullin JM, McGinn MT. The phorbol ester, TPA, increases transepithelial epidermal growth factor flux. *FEBS Lett.* 1987;22:359-364.
148. Mullin JM, Kampherstein JA, Laughlin KV, Saladik DT, Soler AP. Transepithelial paracellular flux leakiness induced by chronic phorbol ester exposure correlates with poly-like foci and redistribution of protein kinase C. *Carcinogenesis* 1997;18:2339-2345.
149. Mullin, JM, Potential interplay between luminal growth factors and increased TJ permeability in epithelial carcinogenesis. *J. Exp. Zool.* 1997;279:484-489.

150. Alroy J Ultrastructure of canine urinary bladder carcinoma. *Vet Pathol* 1979;16:693-701.
151. Robenek H, Schopper C, Fasseke E, Fetting R, and Themann H. Structure and function of the junctional complement of spontaneous and transplanted murine mammary carcinomas. *J. Submicrosc. Cytol.* 1981;13:347-363.
152. Cochand-Priollet B, Raison D, Molinie V, Guillausseau PJ, Wassef M, Bouchaud C Altered gap and tight junctions in human thyroid oncocytic tumors: a study of 8 cases by freeze-fracture. *Ultrastruct Pathol.* 1998;22:413-420.
153. Swift JG, Mukherjee TM, Rowland R Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. *J Submicrosc Cytol* 1983;15:799-810.
154. Polak-Charcon S, Shoham J, Ben-Shaul Y. Tight junctions in epithelial cells of human fetal hindgut, normal colon, and colon adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65:53-62.
155. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM and Mullin JM. Increased TJ permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999, 20:1425-1431.
156. Hoover KB, Liao SY, and Bryant PJ Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity, *Am. J. Pathol.* 1998; 153: 1767-1773.
157. Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, Maeno Y, Doki Y, Inoue M, Monden T, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Tsukita S, Monden M. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol.* 1997;151:45-54.
158. Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C and Anderson JM. The TJ protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *PNAS* 1993;90:7834-7838.
159. Swisshelm K, Machl A, Planitzer S, Robertson R, Kubbies M and Hosier S. SEMP1, a senescence-associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. *Gene* 1999, 226:285-295.
160. Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M. Expression and Targeting of the Tight Junction Protein CLDN1 in CLDN1 negative human breast tumor cells. *J. Cell. Physiol.* 2002, 191:60-68.
161. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene.* 2002;21:2634-2640.
162. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003, 22:2021-2033.

163. Katoh M, Katoh M. CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of claudin gene family. *Int J Mol Med*. 2003;11:683-689.
164. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res*. 2000;12:469-476.
165. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently over-expressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2567-2575.
166. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*. 2001;61:7878-7881.
167. Kraemer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K. and Weber, B.H.F., Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum. Genet*. 2000;107:249-256.
168. Balcer-Kubiczek EK, Yin J, Lin K, Harrison GH, Abraham JM, Meltzer SJ. p53 mutational status and survival of human breast cancer MCF-7 cell variants after exposure to X rays or fission neutrons. *Radiat Res*. 1995;142:256-262.
169. Holst-Hansen C, Johannessen B, Hoyer-Hansen G, Romer J, Ellis V, Brunner N. Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clin Exp Metastasis*. 1996;14:297-307.
170. Garlanda C, Berthier R, Garin J, Stoppacciaro A, Ruco L, Vittet D, Gulino D, Matteucci C, Mantovani A, Vecchi A, Dejana E. Characterization of MEC 14.7, a new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: a useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors. *Eur J Cell Biol*. 1997;73:368-377.
171. Fukazawa H, Mizuno S, Uehara Y. A microplate assay for quantitation of anchorage independent growth of transformed cells. *Anal Biochem*. 1995;228:83-90.
172. Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31:325-335.
173. Machl, AW, Planitzer S, and Kubbies, M. A novel, membrane receptor-based retroviral vector for Fanconi anemia group C gene therapy. *Gene Ther*. 1997;4:339-345.
174. Hoevel TH Dissertation, Universität Würzburg 2001.
175. Yuhas JM, Tarleton AE. Dormancy and spontaneous recurrence of human breast cancer in vitro. *Cancer Res*. 1978;38:3584-3589.
176. Eckert, LB, McFall, A, Murphy, GA, Zhou, H, Sartor, CI and Lineberger, CJ, Activation of HER2 and Ras signaling pathways in human breast cancer cell lines and their role in anoikis. *Proc. Am. Assoc. Cancer Research* 2002;43:892.

177. van der Burg B, van der Leede BM, Kwakkenbos-Isbrucker L, Salverda S, de Laat SW, van der Saag PT. Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;91:149-157.
178. Swisshelm K, Ryan K, Lee X, Tsou HC, Peacocke M, Sager R. Downregulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 1994;5:133-141.
179. Roman SD, Clarke CL, Hall RE, Alexander IE, Sutherland RL. Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1992;52:2236-2242.
180. Fitzgerald P, Teng M, Chandraratna RA, Heyman RA, Allegretto EA. Retinoic acid receptor alpha expression correlates with retinoid-induced growth inhibition of human breast cancer cells regardless of estrogen receptor status. *Cancer Res.* 1997;57:2642-2650.
181. Sommer KM, Chen LI, Treuting PM, Smith LT, Swisshelm K. Elevated retinoic acid receptor beta (4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8651-8656.
182. Zhao Z, Zhang ZP, Soprano DR, Soprano KJ. Effect of 9-cis-retinoic acid on growth and RXR expression in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 1995;219:555-561.
183. Wu Q, Dawson MI, Zheng Y, Hobbs PD, Agadir A, Jong L, Li Y, Liu R, Lin B, Zhang XK. Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6598-6608.
184. Apfel C, Eckardt K. Data from retinoid binding and transactivation assay. Roche Report 2000; Unpublished results.
185. Melnick A, Licht JD. Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol.* 2002;9:322-332.
186. Mahlknecht U, Hoelzer D. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med.* 2000;6: 623-644.
187. Abe M, Kufe DW. Sodium butyrate induction of milk-related antigens in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1984;44:4574-4577.
188. Davis T, Kennedy C, Chiew YE, Clarke CL, deFazio A. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation and modulate cell cycle gene expression in normal mammary epithelial cells. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4334-4342.
189. Zhou Q, Melkounian ZK, Lucktong A, Moniwa M, Davie JR, Strobl JS. Rapid induction of histone hyperacetylation and cellular differentiation in human breast tumor cell lines following degradation of histone deacetylase-1. *J Biol Chem.* 2000;275:35256-35263.
190. Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61:8492-8497.

191. Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cereijido M. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol.* 1985;86:113-125.
192. Gumbiner B, Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol.* 1986; 102(2):457-468.
193. Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL, Imhof BA. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol.* 1985;101:1307-1311.
194. Gaetano C, Zannini S, Limonta J, Boussadia o, Moore R, Kemler R, Amendola E, De Felice M, Di Lauro R, Nitsch L. Conditional Inactivation of E-Cadherin and Beta-Catenin in the thyroid gland. *ELSO Proceedings* 2003;132: 297.
195. Kubota, K. et al. Ca^{2+} -independent cell adhesion activity of claudins, integral membrane proteins of tight junctions. *Curr Biol.* 1999; 9:1035-1038.
196. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1987;113:101-122.
197. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988;240:177-184
198. Tannock IF. Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1970;30:2470-2476.
199. Urnov FD, Wolffe AP. Chromatin organization and human disease. *Emerging Ther. Targets* 2000;4: 665-685
200. Timmerman S. Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58: 728-736
201. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control and cancer. *J. Cell. Physiol.* 2001;184:1-16
202. Rein T, De Pamphilis, ML, Zorbas, H. DNA methylation and related modifications: A survey of detection methods. *Nucleic Acids Research.* 1998;26: 2255-2264.
203. Wu R, ed. Recombinant DNA, Part G. Section III: Reporter Genes. *Methods Enzymology*, Vol. 216. Academic Press, San Diego, 1992.
204. Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:477-487.
205. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci.* 2000;113:2085-2090.
206. Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol.* 1999;276:1279-1288.

-
207. Nakshatri H, Goulet RJ Jr. NF-kappaB and breast cancer. *Curr Probl Cancer*. 2002;26:282-309.
208. Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2000;60:1085-1089.
209. Clarkson RW, Watson CJ. NF-kappaB and apoptosis in mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999;4:165-175.
210. Lacaz-Vieira F, Jaeger MM, Farshori P, Kachar B. Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *J Membr Biol*. 1999 Apr 1;168:289-297
211. RNA interference: on the road to an alternate therapeutic strategy! *Rev Med Virol*. 2003;13:373-385.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2 Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic Acid)
ATCC	American Tissue Culture Collection
BSA	Rinderserum Albumin
CMV	Cytomegalie Virus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflußzytometrie)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
CLDN1	Claudin-1
l-NGFR	low affinity nerve growth factor receptor
LTR	long terminal repeat
mAK	monoklonaler Antikörper
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylendifluorid
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RT	Reverse Transkription
RTP	Ribonukleosidtriphosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Borat-gepufferte EDTA-Lösung
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol

Publikationen

Originalarbeiten:

Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M. Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J Cell Physiol.* 2002 Apr;191(1):60-68.

Hoevel T*, Macek R*, Swisshelm K, Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer.* 2004 Jan 20;108(3):374-383. *The first two authors contributed equally to this paper.

Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Expression and function of tight junction associated molecules in human breast tumor cells is not affected by the Ras-MEK1 pathway. *Cell Mol Biol.* 2003 Feb;49(1):1-11.

Macek R, Dietmann G, Hoevel T, Swisshelm K, Bauer S, Kubbies M. Inhibition of human breast tumor xenograft growth by cell membrane specific expression of claudin-1. *Cancer Research* submitted.

Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Heterogeneity of retinoid receptor pathway involvement of claudin-1 expression in human breast cancer cell lines (in preparation).

Macek R, Kubbies M. HDAC inhibition indicates regulation of tight junction molecule expression in breast cancer cells (in preparation).

Posterpresentationen:

Claudin-1 induced apoptosis in breast tumor spheroids. Macek R, Hoevel T, Swisshelm K, Kubbies M. 14th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Frankfurt, 19.-22. November 2002

Expression and function of TJ proteins is not affected by the Ras-MEK1 pathway in breast cancer cells. Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. 12th International AEK Cancer Congress, Würzburg, 25.-28. März 2003

Claudin-1 dependent apoptosis in breast tumor spheroids. Macek R, Hoevel T, Swisshelm K, Kubbies M. European Life Science Organisation (ELSO) 2003 Conference, Dresden, 20.-24. September 2003

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer danke ich für die Begutachtung und Vertretung der Dissertation vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kubbies für die fachliche Betreuung dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft während des gesamten Zeitraumes der Promotion.

Herrn Dr. Reinhard Rachel und Herrn Dr. Arno Schad danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung elektronenmikroskopischer Untersuchungen.

Für die Hilfe bei der Durchführung des Tierversuchs und immunhistochemischer Analysen bedanke ich mich insbesondere bei Gabi Dietmann sowie bei Petra Heiden und Liese Lipponer aus der ehemaligen Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Bauer.

Den Praktikantinnen Grace Kyle, Hanna Hartmann, Fanny Delegrange, Katherine Thompson, Heike Knetsch, Anneline Courtois und Lisa Fass, die mich in meiner Arbeit bei Roche unterstützt haben, danke ich für die wertvolle Mitarbeit.

Mein Dank gilt meinen Kollegen und Mitdoktoranden Vesna Evtimova, Nesrine Tarbe, Kirsten Dettmar, Robert De Lange, Stephanie Lösch, Malte Weber, Christian Klein, Marion Hirt, Nicole Euer, Michael Schraeml, Sonia Krauss, Janet Kenklies und Dirk Demuth für die Diskussionsbereitschaft und das persönliche Arbeitsklima.

Frau Paul, Frau Böhm und Frau Höcherl danke ich für die Bereitstellung von Materialien. Besonders möchte ich mich bei Frau Paul für die Unterstützung bei Softwareproblemen bedanken.

Zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei allen hilfsbereiten Mitarbeitern der Roche Pharmaforschung im Werk Penzberg für die durchwegs angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere bei meinen netten Kolleginnen und Kollegen aus der Zellanalytik Alexandra Schmid, Andrea Ivascu, Irene Leonhardt, Gabi Jobs, Kathrin Schott, Daniela Oguntke, Erika Herzmann, Sandra Bunte und Bernard Goller.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Penzberg, den 8. Dezember 2003

(Robert Macek)

Lebenslauf

Name: Robert Macek

Geburtsdatum: 16. August 1972

Familienstand: verheiratet

Beruf: Diplombiologe

Schulausbildung

1979-1983 Grundschule, Emmerting

1983-1992 Aventinus-Gymnasium, Burghausen

Berufsausbildung

10/92-9/95 Berufsfachschule für Krankenpflege, Burghausen

Studium

11/95-12/99 Studium der Biologie an der Albertus-Magnus Universität Regensburg

Schwerpunkt: Biochemie

Nebenfächer: Mikrobiologie, Genetik, Organische Chemie

Wissenschaftliche Tätigkeit

01/00-12/00 Diplomarbeit am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie,
Regensburg

Thema: Anwendung einer neuen Methode zur selektiven Isotopenmarkierung
durch Protein-trans-Splicing auf das Ran-RanBP2 System

03/01-12/03 Promotion bei der Roche Diagnostics GmbH, Abteilung für Zellbiologie,
Werk Penzberg

Thema: Untersuchungen zur Funktion und Regulation des Tight Junction
Moleküls Claudin-1 in der Brusttumorgenese

